

Lorena
Morales Martínez

Tesis doctoral

Aplicación de la Cromatografía
Líquida de Alta y Ultra Resolución
para el Estudio de Intoxicaciones por
Drogas de Abuso y Antidepresivos

Santiago de Compostela, 2019



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA Y ULTRA
RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE
INTOXICACIONES POR DROGAS DE
ABUSO Y ANTIDEPRESIVOS**

Lorena Morales Martínez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES Y NUEVAS ESTRATEGIAS
EN CIENCIAS FORENSES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA Y ULTRA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE INTOXICACIONES POR DROGAS DE ABUSO Y ANTIDEPRESIVOS

Dña. Lorena Morales Martínez.

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 3 de Diciembre de 2019

Fdo. Lorena Morales Martínez





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA Y ULTRA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE INTOXICACIONES POR DROGAS DE ABUSO Y ANTIDEPRESIVOS

Dña. Purificación Fernández Gómez.

Dña. Antonia M. Carro Díaz

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Lorena Morales Martínez, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 3 de Diciembre de 2019

Fdo. Purificación Fernández Gómez

Fdo. Antonia M. Carro Díaz





DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA Y ULTRA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE INTOXICACIONES POR DROGAS DE ABUSO Y ANTIDEPRESIVOS

Dña. Lorena Morales Martínez

Declara no tener ningún conflicto de interés.

En Santiago a 3 de Diciembre de 2019

Fdo. Lorena Morales Martínez





ASPECTOS ÉTICOS

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA Y ULTRA RESOLUCIÓN PARA EL ESTUDIO DE INTOXICACIONES POR DROGAS DE ABUSO Y ANTIDEPRESIVOS

Dña. Lorena Morales Martínez

Declara que:

Las investigaciones de esta tesis se realizaron siguiendo la legislación vigente en el momento de la realización de los trabajos, en cuanto al tratamiento y protección de los datos de carácter personal, de acuerdo con:

Los "Principios éticos para la investigación médica implicando seres humanos". World Medical Association. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA - J. Am. Med. Assoc. 2013; 310: 2191-2194

La ley 14/2007 «BOE» núm. 159, de 4 de julio de 2007 Capítulo III Utilización de muestras biológicas humanas con fines de investigación biomédica pp. 26-28

El informe favorable del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia. Código de Registro: 2015/488 (Anexos).

Existe un compromiso, por parte de la doctoranda y las directoras de la tesis, de garantizar el cumplimiento de los principios éticos y la normativa vigente referida a la investigación.

En Santiago a 3 de Diciembre de 2019

Fdo. Lorena Morales Martínez



AGRADECIMIENTOS

*A la Doctora Purificación Fernández Gómez,
Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de
Compostela, por su inestimable dirección, su gran generosidad, su
apoyo incondicional y su paciencia infinita.*

*A la Doctora Antonia M. Carro Díaz, Profesora Titular de Química
Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela, por su acer-
tada dirección, su gran ayuda y sus numerosas aportaciones.*

*A Cristina, compañera y amiga,
por tantos momentos compartidos en este trabajo.*

*A Jose y a mis pequeños, Marcos y David,
por tanto tiempo prestado, comprensión y alegrías.*

*A mis padres,
por todo, gracias.*



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO	30
1.1.1. Europa	30
1.1.2. España	32
1.2. ASPECTOS GENERALES	38
1.2.1. Opiáceos	38
1.2.2. Cocaína.	39
1.2.3. Antidepresivos	41
1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	42
1.3.1. Opiáceos	42
1.3.2. Cocaína.	44
1.3.3. Antidepresivos	45
1.4. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLÓGICAS	48
1.4.1. Opiáceos	48
1.4.2. Cocaína.	51
1.4.3. Antidepresivos:	54
1.5. MUESTRAS BIOLÓGICAS	58
1.5.1. Plasma	58
1.5.2. Fluido oral	60
1.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA	62
1.6.1. Extracción en fase sólida (SPE)	62
1.6.2. Extracción líquido-líquido (LLE)	64
1.6.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	65
1.6.4. Cromatografía líquida de alta y ultra resolución (HPLC y UPLC).	69
1.7. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	71
1.8. REFERENCIAS	86

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS113

3. METODOLOGÍA119

3.1. EQUIPOS	120
3.2. MATERIAL	120
3.3. PATRONES Y REACTIVOS	121
3.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS	122
3.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:	123
3.6. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FASE MOVIL	125
3.7. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA	126
3.8. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL	127
3.9. ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA	129
3.10. CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS	131
3.10.1. Linealidad y Análisis de regresión	132
3.10.2. Límites de detección y de cuantificación	133
3.10.3. Selectividad	133
3.10.4. Precisión y Exactitud	134
3.10.5. Recuperación	135
3.11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 137

4.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO	139
4.2. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA	143
4.2.1. Optimización de la Extracción en fase sólida (SPE).	144
4.2.2. Validación del Método Analítico.	145
4.2.2.1. Linealidad del método.	145
4.2.2.2. Límites de detección y cuantificación.	148
4.2.2.3. Precisión y exactitud	149
4.2.2.4. Recuperación	151
4.2.2.5. Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas	153
4.2.3. Referencias.	160
4.3. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL	169
4.3.1. Optimización de la Extracción líquido-líquido (LLE).	170
4.3.2. Validación del método analítico	172
4.3.2.1 Linealidad del método	172
4.3.2.2 Límites de detección y cuantificación	175

4.3.2.3	Precisión, Exactitud y Recuperación.	176
4.3.2.4	Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas	180
4.3.3.	Referencias.	185
4.4.	IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTIDEPRESIVOS	190
4.5	ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA	192
4.5.1	Optimización de la Microextracción Líquido-Líquido	
	Dispersiva (DLLME). Diseño experimental	192
4.5.1.1	Estudio del dispersante.	193
4.5.1.2	Estudio del extractante.	194
4.5.1.3	Estudio del modo de agitación.	195
4.5.1.4	Estudio de la adición de sal	196
4.5.1.5	Diseño de screening	197
4.5.1.6	Diseño de superficie de respuesta	203
4.5.2	Validación de los Métodos Analíticos (UPLC-PDA y	
	UPLC-MS/MS).	208
4.5.2.1	Validación del método analítico (UPLC-PDA)	208
4.5.2.1.1	Linealidad y Análisis de regresión	208
4.5.2.1.2	Límites de detección y cuantificación.	209
4.5.2.1.3	Selectividad	209
4.5.2.1.4	Precisión, Exactitud y Recuperación	211
4.5.2.1.5	Aplicación del método a casos reales de	217
	intoxicación	217
4.5.2.2	Validación del Método Analítico (UPLC-MS/MS)	222
4.5.2.2.1	Linealidad	228
4.5.2.2.2	Límites de detección y cuantificación.	230
4.5.2.2.3	Precisión, Exactitud y Recuperación	232
4.5.3.	Referencias.	234
5.	CONCLUSIONES	243
6.	ANEXOS	247



ACRÓNIMOS

6AM: 6-acetilmorfina
ACN: Acetonitrilo
ADVP: Adicto a Drogas por Vía Parenteral
Alc: Alcohol
ANOVA: Analysis Of Variance
APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API: Atmospheric Pressure Ionization
ATD: Antidepresivos
BEG: Benzoilecgonina
BZD: Benzodiacepinas
CET: Cocaetileno
COC: Cocaína
COD: Codeína
CPE: Cloud Point Extraction
CS: Column Switching
CV: Coeficiente de Variación
DAD: Diode Array Detector
DLLME: Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva
DMT: N,N-Dimetiltriptamina
EDDP: 2-Etilen-1,5-Dimetil-3,3-Difenil Pirrolidina
EMCDDA: European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction
EMDP: 2-Etil-5-Metil-3,3-Difenil Pirrolidina
EME: Ecgonina Metil Ester
EMIT: Enzimoimmunoensayo
ESC: Escitalopram
ESI: ElectroSpray Ionization
FDA: Food and Drug Administration
FLD: Detector de Fluorescencia
FLUOX: Fluoxetina

FLUVO: Fluvoxamina
GC-FID: Gas Chromatography-Flame Ionization Detector
GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HF-LPME: Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
ICH: International Conference of Harmonization
IMAO: Inhibidores de la Monoaminoxidasa
IRSN: Inhibidores de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina
ISRS: Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina
ISRN: Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Noradrenalina
LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LLE: Liquid Liquid Extraction
LLOQ: Lower Limit of Quantification
LOD: Limit of Detection
LOQ: Limit of Quantification
LSD: Dietilamida del ácido lisérgico
MEKC: Cromatografía Electrocínética Micelar
MEPS: Microextracción con sorbentes empaquetados
MTD: Metadona
MHz: Megahercios
MRF: Morfina
MS: Mass Spectrometry
OEDA: Observatorio Español sobre Drogas y Adicciones
OEDT: Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONU: Organización de Naciones Unidas
PCI: Positive Chemical Ionization
PDA: PhotoDiode Array detector
PF: Preconcentration Factor
QP: Quality Pressure
RSD: Relative Standard Deviation
SAMHSA: Substance Abuse and Mental Health Services Administration
SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction
SEMFYC: Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria
SER: Sertralina
SFO: Solidification of Floating Organic droplets
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SNC: Sistema Nervioso Central
SPE: Solid Phase Extraction
SPME: Solid Phase Microextraction
S/R: Relación Señal-Ruido
THC: Cannabis (Tetrahydrocannabinol)
TOF: Time of Flight
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
US: Ultrasonidos
UV: Ultravioleta
VEN: Venlafaxina
VIS: Visible





ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1. Tasas de prevalencia del consumo de cocaína en Europa, 2000-2016
- Figura 1.2. Tasas de prevalencia del consumo de heroína en Europa, 2006-2016
- Figura 1.3. Evolución de la prevalencia del consumo de cocaína en polvo y edad media de inicio en la población de 15-64 años. España, 1995-2017
- Figura 1.4. Evolución de la prevalencia del consumo de heroína y edad media de inicio de su consumo en la población de 15-64 años. España, 1995-2017
- Figura 1.5. Porcentaje de muertes por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas. España, 1983-2016
- Figura 1.6. Planta *Papaver Somniferum*
- Figura 1.7. Planta *Erythroxylon Coca*
- Figura 1.8. Estructuras químicas de los opiáceos estudiados
- Figura 1.9. Estructuras químicas de la cocaína y metabolitos estudiados
- Figura 1.10. Estructuras químicas de los antidepresivos estudiados
- Figura 1.11. Mecanismo de acción de los opiáceos
- Figura 1.12. Metabolismo de la heroína.
- Figura 1.13. Metabolismo de la codeína
- Figura 1.14. Metabolismo de la metadona
- Figura 1.15. Mecanismo de acción dopaminérgica de la cocaína
- Figura 1.16. Metabolismo de la cocaína
- Figura 1.17. Hipótesis monoaminérgica para antidepresivos
- Figura 1.18. Fotografía del sistema SPE usado
- Figura 1.19. Fotografía de los Toxitubos usados

- Figura 1.20. Fotografías de la jeringuilla y tubos usados en DLLME
- Figura 1.21. Fases de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)
- Figura 1.22. Fotografías de los equipos utilizados (Waters®): (a) HPLC-PDA y (b) ACQUITY UPLC-PDA

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- Figura 2.1. Estimaciones del consumo de drogas en la Unión Europea para cocaína (A) y opioides (B), según el Informe Europeo sobre Drogas 2018

3. METODOLOGÍA

- Figura 3.1. Fases en la recogida de muestras de fluido oral
- Figura 3.2. Proceso de extracción con Toxitubos A para drogas de abuso en fluido oral
- Figura 3.3. Proceso de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para antidepresivos en plasma

4. RESULTADOS DROGAS EN PLASMA

- Figura 4.1. Espectros de Morfina (rojo), Codeína (azul) y 6AM (verde)
- Figura 4.2. Espectros de Cocaína (azul), Cocaetileno (verde) y BEG (rojo)
- Figura 4.3. Espectros de Metadona (azul) y EDDP (rojo)
- Figura 4.4. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM en fase móvil.
- Figura 4.5. Cromatograma de BEG, Cocaína y Cocaetileno en fase móvil
- Figura 4.6. Cromatograma de EDDP y Metadona en fase móvil

- Figura 4.7. Cromatogramas de dos muestras de plasma blanco extraídos con cartuchos Oasis-HLB y Bond Elut Certify (HPLC-PDA)
- Figura 4.8. Estudio comparativo de la precisión intra-día e inter-día para las drogas de abuso en plasma (2 y 10 $\mu\text{g/mL}$)
- Figura 4.9. Estudio comparativo de la exactitud, en términos de % Recuperación, a dos concentraciones de las drogas de abuso en plasma
- Figura 4.10. Distribución de las drogas encontradas en 21 muestras de plasma de sujetos consumidores de drogas de abuso

DROGAS EN FLUIDO ORAL

- Figura 4.11. Dispositivos comerciales para Extracción Líquido Líquido-LLE (Toxitubos)
- Figura 4.12. Cromatograma tridimensional de las drogas de abuso en fluido oral
- Figura 4.13. Dos cromatogramas monitorizados a 233 nm: fluido oral “blanco” (color rojo) y fluido oral conteniendo las drogas de concentración 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (color negro)
- Figura 4.14. Límites de detección y cuantificación de las drogas en fluido oral
- Figura 4.15. Precisión de las drogas en fluido oral
- Figura 4.16. Exactitud, en términos de % Recuperación media, para las drogas en fluido oral
- Figura 4.17. Distribución de las drogas encontradas en 29 muestras de fluido oral

ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

- Figura 4.18. Espectros de absorción correspondientes a la Mirtazapina (rojo), Venlafaxina (azul), Escitalopram (verde), Fluvoxamina (violeta), Fluoxetina (rosa) y Sertralina (marrón)
- Figura 4.19. Protocolo previo al diseño de experimentos para la DLLME con antidepresivos (venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina)
- Figura 4.20. Estudio comparativo de varios dispersantes para la DLLME

- Figura 4.21. Estudio comparativo de varios extractantes para la DLLME
- Figura 4.22. Estudio comparativo de varios tipos de agitación para la DLLME
- Figura 4.23. Estudio comparativo de varios tiempos de agitación con ultrasonidos
- Figura 4.24. Estudio comparativo de la DLLME con y sin adición de sal
- Figura 4.25. Influencia de los factores para la venlafaxina
- Figura 4.26. Influencia de los factores para el escitalopram
- Figura 4.27. Influencia de los factores para la fluvoxamina
- Figura 4.28. Influencia de los factores para la fluoxetina
- Figura 4.29. Influencia de los factores para la sertralina
- Figura 4.30. Variación de la respuesta de la venlafaxina en el plano pH-vol ACN
- Figura 4.31. Variación de la respuesta del escitalopram en el plano pH-vol ACN
- Figura 4.32. Variación de la respuesta de la fluvoxamina en el plano pH-vol ACN
- Figura 4.33. Variación de la respuesta de la fluoxetina en el plano pH-vol ACN
- Figura 4.34. Variación de la respuesta de la sertralina en el plano pH-vol ACN
- Figura 4.35. Variación de la deseabilidad en el plano: pH-vol ACN. Gráfico en 3D
- Figura 4.36. Variación de la deseabilidad en el plano: pH-vol ACN. Gráfico en 2D
- Figura 4.37. Dos cromatogramas UPLC-PDA: (1) Plasma con los antidepresivos-1 μ g/mL y (2) Plasma blanco.
- Figura 4.38. Precisión intra-día (repetibilidad) a tres niveles de concentración (N=5)
- Figura 4.39. Precisión inter-día (reproducibilidad) a tres niveles de concentración (N=5)
- Figura 4.40. Recuperación de los antidepresivos a tres niveles de concentración (N=5)
- Figura 4.41. Porcentaje de casos positivos de antidepresivos en las muestras analizadas

- Figura 4.42. Cromatograma correspondiente al caso número 4 (UPLC-PDA)
- Figura 4.43. Optimización del voltaje del capilar en ESI+ para los antidepresivos estudiados
- Figura 4.44. Optimización de la temperatura de desolvatación para los antidepresivos
- Figura 4.45. Optimización del flujo de gas de desolvatación para los antidepresivos estudiados
- Figura 4.46. Optimización del flujo de gas de nebulización para los antidepresivos estudiados
- Figura 4.47. Optimización de la temperatura de la fuente de ionización para los antidepresivos estudiados
- Figura 4.48. Cromatogramas individuales de cada patrón de antidepresivos
- Figura 4.49. Recta de calibrado en fase móvil (azul) y matrix-matched (rojo) para venlafaxina
- Figura 4.50. Recta de calibrado en fase móvil (azul) y matrix-matched (rojo) para escitalopram



ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

- Tabla 1.1. Número de fallecidos por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas, según la sustancia detectada en el análisis toxicológico. España, 2007-2016
- Tabla 1.2. Clasificación de los antidepresivos estudiados, según su mecanismo de acción
- Tabla 1.3. Parámetros farmacocinéticos y dosificación de los antidepresivos
- Tabla 1.4. Relación de la concentración saliva/plasma de opiáceos y cocaína
- Tabla 1.5. Revisión bibliográfica sobre drogas de abuso
- Tabla 1.6. Revisión bibliográfica sobre antidepresivos

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA

- Tabla 3.1. Gradiente de la fase móvil en HPLC (drogas de abuso en plasma usando SPE y en fluido oral usando Toxitubos A)
- Tabla 3.2. Gradiente de la fase móvil en UPLC (Antidepresivos en plasma usando DLLME)
- Tabla 3.3. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en fase móvil
- Tabla 3.4. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en plasma (SPE)
- Tabla 3.5. Protocolo de SPE para drogas de abuso en plasma

- Tabla 3.6. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en fluido oral (Toxitubos A)
- Tabla 3.7. Preparación de disoluciones de calibrado de antidepresivos en plasma (DLLME)

4. RESULTADOS

DROGAS EN PLASMA

- Tabla 4.1. Análisis de Regresión para las drogas en plasma
- Tabla 4.2. Análisis de la Varianza (ANOVA)
- Tabla 4.3. Límites de detección y cuantificación de las drogas en plasma
- Tabla 4.4. Precisión y exactitud intra-día de las drogas en plasma.
- Tabla 4.5. Precisión y exactitud inter-día de las drogas en plasma.
- Tabla 4.6. Recuperación de las drogas en plasma
- Tabla 4.7. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos en 21 muertes relacionadas con heroína, cocaína y/o metadona
- Tabla 4.8. Revisión bibliográfica: niveles plasmáticos ($\mu\text{g/mL}$) en intoxicaciones por drogas

DROGAS EN FLUIDO ORAL

- Tabla 4.9. Análisis de regresión para las drogas en fluido oral
- Tabla 4.10 Análisis de la Varianza (ANOVA)
- Tabla 4.11. Límites de detección y cuantificación de las drogas en fluido oral
- Tabla 4.12. Precisión, Exactitud y Recuperación de las drogas en fluido oral
- Tabla 4.13. Otros métodos de cromatografía líquida utilizados para determinar opiáceos y/o cocaína en fluido oral
- Tabla 4.14. Niveles de las drogas ($\mu\text{g/mL}$) encontradas en 29 muestras de fluido oral
- Tabla 4.15. Revisión bibliográfica: concentraciones medias ($\mu\text{g/mL}$), número de casos positivos y/o intervalos de concentración de las drogas en fluido oral de consumidores

ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

- Tabla 4.16. Dominio experimental
- Tabla 4.17. Matriz de experiencias
- Tabla 4.18. Plan de experimentación
- Tabla 4.19. Áreas de los picos cromatográficos obtenidas en este diseño
- Tabla 4.20. Dominio experimental para el diseño pentágono
- Tabla 4.21. Matriz de experiencias para el diseño pentágono
- Tabla 4.22. Plan de experimentación para el diseño pentágono
- Tabla 4.23. Áreas de los picos cromatográficos obtenidas en el diseño pentágono
- Tabla 4.24. Coordenadas del máximo
- Tabla 4.25. Características del máximo
- Tabla 4.26. Análisis de regresión de los antidepresivos en plasma
- Tabla 4.27. Límites de detección y cuantificación de los antidepresivos
- Tabla 4.28. Precisión intra-día e interdía para los antidepresivos
- Tabla 4.29. Recuperación de los antidepresivos a tres niveles de concentración (N=5)
- Tabla 4.30. Otros métodos de cromatografía líquida para el estudio de antidepresivos en sangre y derivados
- Tabla 4.31. Concentraciones plasmáticas de los antidepresivos en 24 casos de intoxicación
- Tabla 4.32. Niveles terapéuticos y tóxicos en muestras de plasma
- Tabla 4.33. Revisión bibliográfica: concentraciones plasmáticas medias en intoxicaciones por antidepresivos (ng/mL)
- Tabla 4.34. Condiciones experimentales del método UPLC-MS/MS
- Tabla 4.35. Gradiente seleccionado para la separación cromatográfica
- Tabla 4.36. Condiciones de UPLC- MS/MS optimizadas para los antidepresivos estudiados
- Tabla 4.37. Parámetros de regresión en el calibrado en fase móvil mediante UPLC-MS/MS
- Tabla 4.38. Parámetros de regresión por el método Matrix-Matched mediante UPLC-MS/MS
- Tabla 4.39. Efecto matriz para cada antidepresivo

- Tabla 4.40. Límites de detección y cuantificación de los antidepresivos (ng/mL)
- Tabla 4.41. Coeficientes de variación intradía e interdía
- Tabla 4.42. Recuperaciones (%) para tres niveles de concentración



RESUMO

Esta tese de doutoramento describe e desenvolve diferentes aplicacións no campo da toxicoloxía forense. As aplicacións céntranse en: (i) mostras de plasma e saliva para a determinación de drogas de abuso e (ii) mostras de plasma para o control clínico e toxicolóxico de antidepressivos.

A preparación da mostra é un paso esencial para os análises toxicolóxicos forenses, que normalmente están relacionados con matrices biolóxicas complexas e con baixas concentracións de analito. Polo tanto, o obxectivo principal é o desenvolvemento de metodoloxías analíticas que impliquen o uso de diferentes técnicas de extracción, como a extracción en fase sólida, a extracción líquido-líquido con toxitubos e a microextracción líquido-líquido dispersiva axudada con ultrasóns. O uso destas técnicas supuxo unha importante evolución para adaptarse á cantidade de mostra biolóxica dispoñible, reducir o consumo de disolventes orgánicos e acurtar a exposición do analista a substancias potencialmente tóxicas. Así, esta etapa supón un enfoque hacia a química verde.

Polo tanto, descríbense diferentes métodos analíticos simples, económicos e eficaces para resolver os problemas de cada aplicación, que inclúen a identificación e cuantificación dos analitos mediante cromatografía líquida de alta e/ou ultra resolución (HPLC e/ou UPLC). Ademais, unha etapa de optimización é fundamental para establecer as mellores condicións experimentais ao aplicar técnicas innovadoras de extracción como a microextracción líquido-líquido dispersiva. Neste contexto, os deseños de experimentos son estratexias quimiométricas que facilitan a obtención desta información, minimizando o tempo, o esforzo e os recursos.

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral describe y desarrolla diferentes aplicaciones en el ámbito de la toxicología forense. Las aplicaciones se centran en: (i) muestras de plasma y saliva para la determinación de drogas de abuso y (ii) muestras de plasma para el control clínico y toxicológico de antidepresivos.

La preparación de la muestra es un paso esencial para los análisis toxicológicos forenses, que normalmente están relacionados con matrices biológicas complejas y bajas concentraciones de analito. Por ello, el objetivo principal es el desarrollo de metodologías analíticas que conlleven el empleo de diferentes técnicas de extracción, como la extracción en fase sólida, la extracción líquido-líquido con toxitubos y la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida con ultrasonidos. La utilización de estas técnicas ha supuesto una importante evolución para adecuarse a la cantidad de muestra biológica disponible, disminuir el consumo de disolventes orgánicos y acortar la exposición del analista a sustancias potencialmente tóxicas. Así pues, esta etapa supone un enfoque hacia la química verde.

Por tanto, se describen diferentes métodos analíticos simples, económicos y eficientes para resolver los problemas de cada aplicación, que incluyen la identificación y cuantificación de los analitos mediante cromatografía líquida de alta y/o ultra resolución (HPLC y/o UPLC). Además, una etapa de optimización es crítica para establecer las mejores condiciones experimentales al aplicar técnicas innovadoras de extracción como la microextracción líquido-líquido dispersiva. En este contexto, los diseños de experimentos son estrategias quimiométricas que facilitan la obtención de esta información, minimizando tiempo, esfuerzo y recursos.

ABSTRACT

This Doctoral Thesis describes and develops different applications in the field of forensic toxicology. The applications focus on: (i) plasma and saliva samples for the determination of drugs of abuse and (ii) plasma samples for the clinical and toxicological control of antidepressants.

Sample preparation is an essential step for forensic toxicological analyses, which are usually related to complex biological matrices and low analyte concentrations. So, the main objective is the development of analytical methodologies that involve the use of different extraction techniques, such as solid phase extraction, liquid-liquid extraction with toxtubes and dispersive liquid-liquid microextraction assisted with ultrasound. The use of these techniques has meant an important evolution to adapt to the amount of biological sample available, reduce the consumption of organic solvents and shorten the exposure of analyst exposure to potentially toxic substances. Thus, this stage supposes a focus towards the green chemistry.

Therefore, different simple, economical and efficient analytical methods are described to solve the problems of each application, which include the identification and quantification of the analytes by means of high and/or ultra resolution liquid chromatography (HPLC and/or UPLC). In addition, an optimization stage is critical to establish the best experimental conditions when applying innovative extraction techniques such as liquid-liquid dispersive microextraction. In this context, the designs of experiments are chemometric strategies that facilitate the obtaining of this information, minimizing time, effort and resources.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO

1.1.1. Europa

1.1.2. España

1.2. ASPECTOS GENERALES

1.2.1. Opiáceos

1.2.2. Cocaína

1.2.3. Antidepresivos

1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

1.3.1. Opiáceos

1.3.2. Cocaína

1.3.3. Antidepresivos

1.4. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLÓGICAS

1.4.1. Opiáceos

1.4.2. Cocaína

1.4.3. Antidepresivos

1.5. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.5.1. Plasma

1.5.2. Fluido oral

1.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

1.6.1. Extracción en fase sólida (SPE)

1.6.2. Extracción líquido-líquido (LLE)

1.6.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

1.6.4. Cromatografía Líquida de Alta y Ultra Resolución
(HPLC y UPLC)

1.7. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.8. REFERENCIAS



1. INTRODUCCIÓN

El consumo de drogas representa uno de los problemas sociosanitarios más preocupantes en el mundo occidental desarrollado, constituyendo una significativa causa de morbilidad y mortalidad. A finales del siglo XIX, junto con la expansión del comercio y las comunicaciones, el consumo de drogas, que hasta entonces sólo afectaba a pequeñas comunidades, comenzó a extenderse. La rápida evolución de la situación social y económica, unida al incremento de disponibilidad de drogas y al creciente fomento de su consumo mundial, ha contribuido a agudizar el problema del uso indebido de las mismas, perjuicios para la salud (SIDA y hepatitis), mayor delincuencia y desestabilización personal, familiar, social y económica.

Desde el punto de vista de la ciencia, *fármaco o droga* es toda sustancia química de origen natural o sintético que afecta a las funciones de los organismos vivos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) puntualiza esta definición concretando que además pueden crear dependencia.

Según la *American Psychiatric Association*, la **dependencia** es todo aquel patrón mal adaptado de abuso de una sustancia que produce trastornos o dificultades físicas importantes desde un punto de vista clínico, siempre que se manifiesten tres (o más) de los factores abajo expuestos en cualquier momento, dentro de un período de 12 meses:

- *Tolerancia*, como la necesidad de consumir una cantidad notablemente superior de la sustancia a fin de conseguir el efecto deseado.
- *Síndrome de Abstinencia*, como un conjunto de síntomas que aparecen después de la interrupción brusca de una sustancia consumida durante largo tiempo.
- Deseo persistente de consumir la sustancia.
- Abandono o reducción de actividades importantes de carácter social, ocupacional o recreativo derivadas del uso de la sustancia.

- Consumo continuado de la sustancia a pesar de conocer la existencia de un problema persistente o recurrente, que con toda probabilidad ha sido motivado por ella.

Algunas drogas ilícitas tienen características farmacocinéticas que promueven la dependencia, incluyendo larga vida media, escasa eliminación de droga libre y tiempo suficiente de exposición a la droga seguido del desarrollo de tolerancia. Generalmente, la severidad de la dependencia se relaciona con el incremento del uso de la droga y con la vía de administración que se utilice.

Según la OMS, la **adicción** se corresponde con un estado de intoxicación crónica, debido al consumo repetido de una droga, natural o sintética, y se caracteriza por:

- Compulsión a continuar consumiendo por cualquier medio.
- Tendencia al aumento de la dosis.
- Dependencia psíquica y generalmente física de los efectos.
- Consecuencias perjudiciales para el individuo y la sociedad.

La adicción se manifiesta en los niveles físico, mental y emocional. Es por ello que la simple suspensión de las drogas, no es suficiente para terminar con esa adicción.

El primer intento internacional para buscar una normativa en el comercio y distribución de sustancias psicotrópicas fue la Convención Internacional del Opio en Shangai, en 1909, integrada por 13 países, que propiciaron la firma en La Haya del primer tratado de fiscalización de estupefacientes, el denominado Convenio Internacional del Opio de 1912.

Con el nacimiento de las Naciones Unidas, tras la segunda Guerra Mundial, se firman los Convenios de 1948 y 1953.

En 1961 se aprobó la Convención Única sobre Estupefacientes, que agrupó y codificó los diferentes tratados multilaterales: se creó la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes que fusionaba en un solo organismo el Órgano de Fiscalización de Estupefacientes y el Comité Central Permanente del Opio. La Convención Única sobre Estupefacientes establece cuatro tipos de listas:

- Lista I: Incluye los opiáceos, la cocaína y los derivados del cannabis. Están sujetos a todos los controles indicados en la Convención.
- Lista II: Incluye las drogas más comúnmente utilizadas con fines médico-terapéuticos. Los controles son menos estrictos. Para su dispensación se exige receta médica.
- Lista III: Incluye los preparados que contienen en su composición los compuestos comprendidos en la lista II en concentraciones inferiores y en proporciones determinadas. También incluye los preparados que, a juicio de la OMS, no se prestan a uso indebido.
- Lista IV: Está integrada por sustancias consideradas peligrosas, sin utilidad terapéutica práctica. Está prohibida su producción, fabricación, exportación, importación, comercio y posesión, con la excepción de su uso en investigación bajo estricto control.

El Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971 ampliaba el sistema internacional de control, incluyendo una serie de sustancias como las anfetaminas, los sedantes hipnóticos y los alucinógenos:

- Lista I: Contiene el grupo de los alucinógenos, LSD, DMT, psilocibina, mescalina, etc. Son sustancias de carácter peligroso y con un posible uso terapéutico más que dudoso. Están sometidas a un estricto control; su empleo queda limitado a la investigación, por lo que se exigen licencias especiales para su fabricación y distribución.
- Lista II: Está formada por sustancias estimulantes, como las anfetaminas (de una muy limitada utilidad terapéutica), analgésicos narcóticos como la fenciclidina, etc. Las medidas de fiscalización son semejantes a las de la lista I, sin las exigencias de éstas en cuanto a fabricación, distribución, etc.
- Lista III: Contiene los barbitúricos de acción rápida y media, que tienen utilidad terapéutica. Los requisitos son semejantes a los de las listas I y II, pero no se exigen autorizaciones para su exportación e importación, ni la presentación estadística de

producción, uso, etc a la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes.

- Lista IV: Incluye tranquilizantes, hipnóticos y analgésicos de amplio uso terapéutico, pero que pueden provocar dependencia; el control es menos estricto que en los casos anteriores.

1.1. CONSUMO DE DROGAS DE ABUSO

1.1.1. Europa

El consumo de drogas es una de las principales causas de muerte entre los jóvenes europeos, tanto directamente por sobredosis (entre 30 y 40 años) como indirectamente por enfermedades y accidentes relacionados con las drogas, actos de violencia y suicidios. Se ha estimado que mueren anualmente entre 10.000 y 20.000 jóvenes, concluyendo que existe una probabilidad unas diez veces mayor de morir que las demás personas de su edad y sexo. En la mayoría de las sobredosis mortales reportadas están presentes la heroína o sus metabolitos, a menudo junto con otros opiáceos (buprenorfina, metadona, fentanilo o tramadol), alcohol y/o benzodiacepinas.

Según el *Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT, 2018)*, más de una cuarta parte de la población europea (92 millones de personas) han consumido drogas ilegales en algún momento de su vida. Se ha detectado un predominio de consumo de cannabis (53,5 millones de hombres y 34,3 millones de mujeres), seguido de lejos por la cocaína (11,8 millones de hombres y 5,2 millones de mujeres). Así pues, la cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida en Europa, con mayor prevalencia en los países del sur y el oeste. Entre los usuarios habituales, puede hacerse una clara distinción entre los más integrados en la sociedad, que suelen inhalar clorhidrato de cocaína, y los marginados, que se administran cocaína por vía parenteral o por vía pulmonar (crack). Se estima que 17,0 millones de adultos europeos (de 15 a 64 años) (el 5,1 % de este grupo de edad) han consumido cocaína en algún momento de su vida. Entre ellos hay unos 2,3 millones de adultos jóvenes de 15 a 34 años, que han consumido la droga durante el último año (**Figura 1.1**)

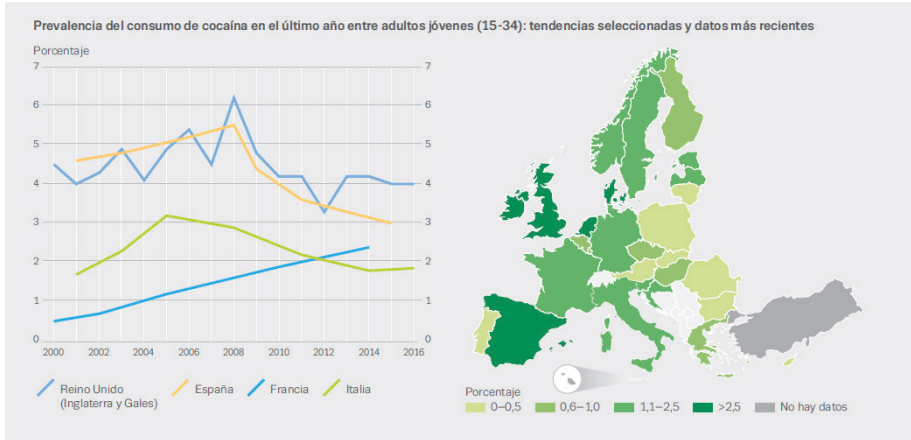


Figura 1.1. Tasas de prevalencia del consumo de cocaína en Europa (2000-2016)
Con permiso de OEDT, 2018.

En cuanto a los opiáceos de alto riesgo, se han detectado 1,3 millones de consumidores problemáticos en 2016 (0,4% de la población europea). El consumo ilegal de estas drogas, en especial la heroína, sigue ocasionando un elevado número de muertes por consumo de drogas en Europa. Después de dos oleadas de adicción a la heroína en las décadas de los setenta y los noventa, en términos generales parece ir disminuyendo la iniciación en su consumo. A escala nacional, las estimaciones de prevalencia de este tipo de consumo varían entre menos de 1 y más de 8 casos por cada 1.000 habitantes de 15 a 64 años de edad. Los cinco países más poblados de la Unión Europea, que representan el 62% de su población, concentran las tres cuartas partes (76%) de su cifra estimada de consumidores de opiáceos de alto riesgo (Alemania, España, Francia, Italia, Reino Unido). De los once países con estimaciones periódicas del consumo de opiáceos de alto riesgo, España e Italia muestran un descenso significativo, mientras que la República Checa muestra un aumento significativo (**Figura 1.2**).

Aunque la heroína es el opiáceo ilegal más consumido, diversas fuentes indican un aumento creciente del consumo de opiáceos sintéticos legales (metadona, buprenorfina y fentanilo). En Estonia, la mayoría de los consumidores tomaban fentanilo, mientras que en Finlandia y

en la República Checa la buprenorfina es la droga más usada. Además, los consumidores que inician tratamiento por problemas relacionados con nuevas sustancias psicoactivas con efectos similares a los de los opioides pueden estar englobados bajo el epígrafe general de opioides (OEDT, 2018).

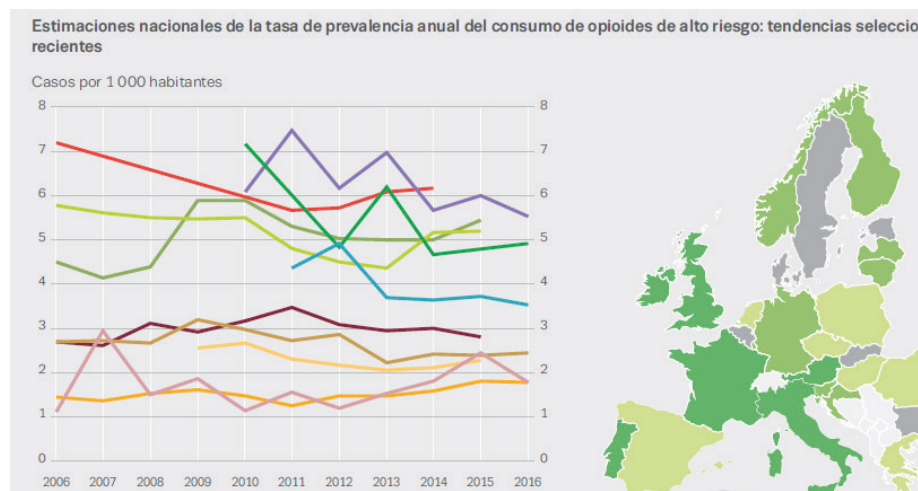


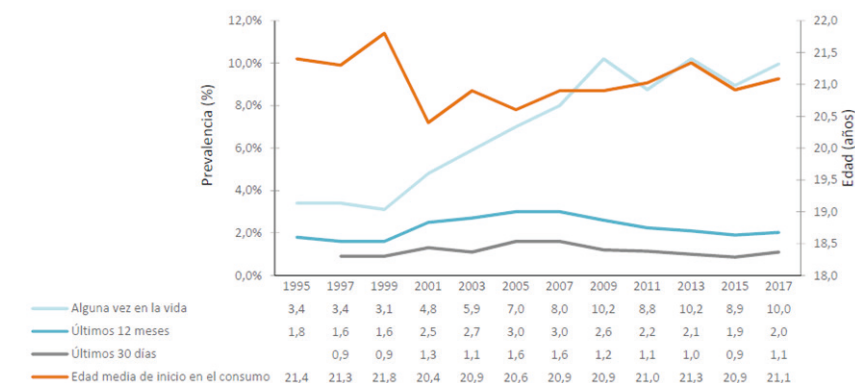
Figura 1.2. Tasas de prevalencia del consumo de heroína en Europa (2006-2016)
Con permiso de OEDT, 2018.

1.1.2. España

Uno de cada diez individuos de 15 a 64 años reconoce haber consumido *cocaína en polvo* alguna vez en la vida (10,0%), manteniéndose dicha prevalencia similar a la que se viene observando desde 2009. La edad media de inicio de consumo está en los 21,1 años en 2017, situándose históricamente entre los 20 y los 22 años. Circunscribiendo el consumo al último año, la prevalencia se sitúa en el 2,0%, continuando así la tendencia estable que comenzó en 2011. Atendiendo al sexo, el consumo de cocaína en polvo, dentro de este tramo temporal, está más extendido entre los hombres que entre las mujeres (3,2% frente a 0,8%), manteniéndose en ambos colectivos en niveles similares a los que se vienen observando en las últimas

ediciones de la encuesta. Respecto al último mes, el 1,1% reconoce haber tomado cocaína en polvo en alguna ocasión en los 30 días previos a la realización de la encuesta (**Figura 1.3**)

Evolución de la prevalencia de consumo de cocaína en polvo y edad media de inicio en el consumo de cocaína en polvo en la población de 15-64 años (%). España, 1995-2017.



FUENTE: OEDA Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES)

Figura 1.3. Evolución de la prevalencia de consumo de cocaína en polvo y edad media de inicio en la población de 15-64 años(%). España (1995-2017). Con permiso de OEDA, 2018.

En 2017, aquellos que han probado alguna vez cocaína en polvo representan el 10,0% de la población, mientras que los que admiten su consumo en los últimos doce meses representan el 2,0% de la población, y los que consumieron durante el último mes suponen el 0,1%.

Por el contrario, la *cocaína base* tiene un consumo muy residual en la población española de 15-64 años. El 1,3% reconoce haberla consumido en alguna ocasión, reduciéndose hasta el 0,3% en el último año y al 0,1% en el último mes. En 2017, los que reconocen haberla consumido alguna vez señalan el primer consumo con 23,2 años (**OEDA, 2018**).

Si se considera el consumo de cocaína de manera global (ya sea en forma de polvo y/o en forma de base), el porcentaje de población que ha consumido cocaína alguna vez en la vida se establece en el 10,3%. Por su parte, aquellos que admitieron un consumo de cocaína en los últimos

12 meses representan el 2,2% de la población. En el tramo temporal del último año, la prevalencia de consumo de cocaína polvo y/o base es mayor entre los hombres, variando desde 3,3% a 4,9% (grupo de 15-24 años). Entre las mujeres, la máxima prevalencia se observa en el grupo de 15 a 24 años (1,4%).

La heroína registra prevalencias residuales en la población de 15 a 64 años, no alcanzando el punto porcentual en el tramo temporal de *alguna vez en la vida*. Evolutivamente, el dato se ha mantenido muy estable durante los últimos años (**Figura 1.4**).

Evolución de la prevalencia de consumo de heroína y edad media de inicio en el consumo de heroína en la población de 15-64 años (%). España, 1995-2017.

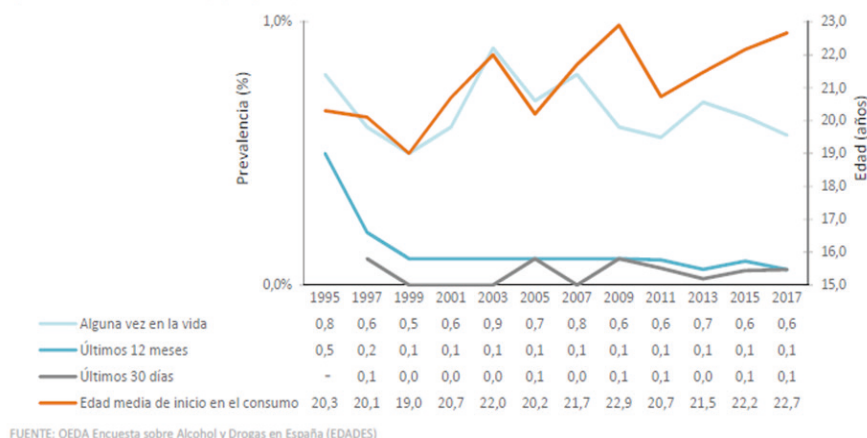


Figura 1.4. Evolución de la prevalencia de consumo de heroína y edad media de inicio de su consumo en la población de 15-64 años. España (1995-2017).
Con permiso de OEDA 2018.

El policonsumo aumenta el riesgo, potenciando los efectos de unas drogas sobre otras, reforzando la adicción, interfiriendo en el diagnóstico y dificultando el tratamiento. *En los últimos 12 meses*, el 41,2% de la población de 15-64 años consumió dos o más sustancias diferentes, mientras que el 42,3% consumió una única sustancia. El policonsumo predomina entre los hombres de 25-34 años; aproximadamente, la mitad de ellos consumió dos o más sustancias diferentes en el último año,

siendo también el grupo de edad donde se aprecia una mayor diferencia entre la prevalencia de policonsumo registrada por hombres y mujeres. *En los últimos 30 días*, el 33,7% de las personas había consumido dos o más sustancias diferentes, mientras que el 41,0% había consumido una única sustancia. Finalmente, una de cada cuatro personas no realizaron ningún consumo durante este periodo.

La percepción de riesgo es generalizada cuando se hace referencia al consumo de heroína, alucinógenos y/o GHB. En el periodo 1995-2017, más del 95% de la población piensa que consumir estas sustancias una vez o menos al mes puede conllevar muchos o bastantes problemas. Lo mismo sucede con respecto a los consumos de cocaína y/o éxtasis, pues prácticamente el 95% de la población advierte muchos o bastantes peligros cuando se consumen estas drogas una vez al mes o con menor frecuencia.

La mortalidad relacionada con el consumo de sustancias psicoactivas es relevante porque es un reflejo importante del impacto social y sanitario del uso de estas sustancias. Sin embargo, la recogida de información no es una tarea fácil pues las defunciones a veces son difíciles de clasificar. En España, tras la epidemia de consumo de heroína de finales de los años setenta y principios de los ochenta, se desarrolló un sistema para recoger las muertes por reacción aguda a opioides y/o cocaína, a partir de fuentes forenses y toxicológicas, y que actualmente incluye otras sustancias.

El *Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones* (OEDA) notifica anualmente los datos de este indicador al EMCDDA (*European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction*). Se incluyen las defunciones notificadas al Registro Específico de Mortalidad por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas en seis ciudades españolas (Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla, Valencia y Zaragoza), que declaran al Indicador de Mortalidad por reacción aguda a opioides y/o cocaína.

En 2016, a nivel nacional, se notificaron 613 defunciones por reacción aguda a sustancias psicoactivas. El perfil se corresponde con un varón mayor de 44 años, soltero, que ha consumido recientemente alguna sustancia, sin signos de venopunción y en cuyo análisis toxicológico

aparece más de una droga psicoactiva (hipnosedantes y opioides, seguidos de cocaína y alcohol).

La **Tabla 1.1** muestra que la presencia de opioides mantiene una tendencia descendente desde 2012. Sin embargo, se puede afirmar que los opioides continúan teniendo una presencia muy significativa entre los fallecidos, especialmente en combinación con otras sustancias, pero la evolución temporal sugiere un posible desplazamiento de la cocaína como acompañante de los opioides.

Tabla 1.1. Número de fallecidos por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas, según las sustancias detectadas en el análisis toxicológico. España*, 2007-2016.

SUSTANCIAS DETECTADAS	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Opioides	340	324	346	409	318	366	337	335	333	320
Cocaína	313	251	247	297	213	280	236	269	253	269
Hipnosedantes	223	191	180	302	265	302	273	342	352	337
Anfetaminas	23	96	17	15	27	23	45	50	35	45
Cannabis	68	65	88	123	100	107	94	86	121	117
Alcohol	130	108	120	149	136	138	136	212	206	215
Nº muertes con información toxicológica	475	424	427	517	408	478	437	520	518	501
Nº total de fallecidos	475	424	438	517	453	519	489	556	600	613

* Se incluyen datos de seis ciudades españolas (Barcelona, Bilbao, Madrid, Sevilla, Valencia y Zaragoza).

Con permiso de OEDA 2017. Indicador de Mortalidad por Reacción Aguda a Sustancias Psicoactivas

Los análisis del Indicador de Mortalidad confirman que las sustancias responsables de los fallecimientos en 2016 son principalmente

los hipnosedantes y los opioides, seguidos de la cocaína y el alcohol. Además, el 95,8% de los fallecidos muestra más de una sustancia en su análisis toxicológico. Se observa una estabilización desde 2011 del número de fallecidos por opioides, así como un aumento de los hipnosedantes desde 2011 a 2015. En 2016, desciende ligeramente el número de fallecidos en los que se detectan opioides e hipnosedantes. Por último, el número de fallecidos por cocaína es bastante estable desde 2014 a 2016.

La **Figura 1.5** muestra los porcentajes de detección de cada sustancia respecto al total de fallecidos con información toxicológica. El porcentaje se puede ver alterado por el aumento o disminución del número de fallecimientos notificados, por lo que deben tomarse como referencia las cifras de números absolutos para poder interpretar los porcentajes correctamente (**Tabla 1.1**).

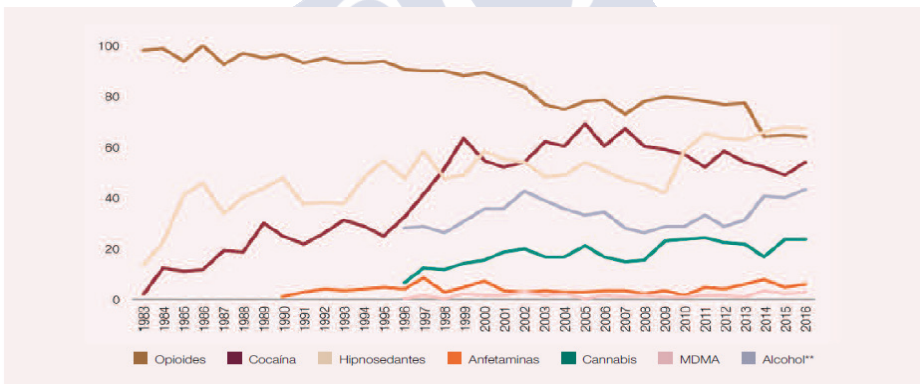


Figura 1.5. Porcentaje de muertes por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas, según el tipo de sustancia detectado en el análisis toxicológico. España (1983-2016). Con permiso de OEDA, 2017.

Así, la evolución temporal de la presencia de cada sustancia en el total de fallecimientos notificados muestra desde 1996 un descenso en el porcentaje de fallecidos en los que se identifican opioides (77,3% de los casos en 2013 y 63,9% en 2017), lo que podría explicarse por el aumento de la cifra total de fallecidos. También se observa un aumento de la cocaína y del cannabis. Tanto los opioides como la cocaína

son sustancias muy presentes en este indicador: entre los fallecidos en 2016 se detectan opioides, junto con cocaína (53%). Por otra parte, cabe destacar que de los 269 casos positivos a cocaína, los opioides están presentes en más del 63%, y sólo en el 6% de los casos, la cocaína es la única sustancia detectada.

En el grupo de opioides, la metadona ha estado presente en 182 fallecidos en 2016 (36%), siendo el único opioide en 96 casos. Evolutivamente, desciende la presencia de metadona hasta 2015, pero en 2016 parece volver a cifras similares a las de 2014.

1.2. ASPECTOS GENERALES

1.2.1. Opiáceos

Son unas sustancias extraídas del opio o jugo de la cápsula de adormidera (**Figura 1.6**), que incluyen la morfina, codeína, tebaína, y una gran variedad de análogos semisintéticos como la heroína. Entre los alcaloides naturales, el más importante es la morfina.



Figura 1.6. Planta *Papaver Somniferum*.

El uso del opio es tan antiguo como la propia civilización humana. En enterramientos del Neolítico se han encontrado restos de cápsulas de la planta *Papaver Somniferum*, de las que se obtenía el “opio”, lo que demuestra que sus propiedades narcóticas eran conocidas y aprovechadas. Homero (900 aC) lo menciona en sus escritos, Hipócrates (400 aC) lo

usa como medicamento, y Galeno (siglo II) fue una gran divulgador de su uso. Hasta los siglos XVII y XVIII solo se tomaba como narcótico y analgésico, pero se hizo adictógeno al extenderse la costumbre de fumarlo. En 1805, Sertürner consiguió aislar la morfina a partir del opio, y continuó su investigación administrándosela a sí mismo, hasta que se murió por una sobredosis. Durante las guerras del opio (1839-1842), los ingleses obligaban a los gobernantes chinos a aceptar opio en pago por sus sedas y té, pero comienza a haber un sentimiento de repulsa al empleo del opio y la morfina debido a su carácter adictógeno. La guerra de secesión americana (1861-1865) genera cientos de miles de adictos a la morfina entre los heridos de guerra, y con la aparición de la jeringuilla hipodérmica el uso parenteral se extiende a los círculos artísticos y literarios, produciéndose un abuso compulsivo de la droga. En 1898 se sintetiza la heroína, en un intento de buscar sustitutos menos peligrosos y más eficaces que la morfina, pero resultó ser mucho más adictógena. Así, en 1912 se establece el Convenio de La Haya, que es la primera legislación internacional para el control de narcóticos.

La metadona fue sintetizada por primera vez en Alemania durante la segunda Guerra Mundial. Se utilizó como alternativa a la morfina en el tratamiento del dolor, debido a su efecto analgésico-narcótico similar, pero con duración de acción más larga y menor acción sedante. Por esto, actualmente se usa como droga opiácea de mantenimiento en heroinómanos siendo capaz de suprimir los síntomas de abstinencia (Payte, 1991).

1.2.2. Cocaína

Es una droga psicoactiva que se encuentra en las hojas de un arbusto (*Erythroxylon coca*), planta originaria de los Andes y cultivada en América del Sur desde hace más de 20 siglos (**Figura 1.7**). El uso de la coca data del año 5000 aC; se ha encontrado en la boca de las momias y en sacos dispuestos en las tumbas para asistir al difunto en su otra vida. Los arqueólogos hallaron evidencias de que, en el año 1500 aC se usaban las hojas de coca, como anestésico en cirugía cerebral. La usaron los braceros al norte de los Andes para combatir el cansancio mientras extraían estaño o plata de las minas o para labrar los campos. Las hojas

se masticaban siempre mezclándolas con un polvo alcalino y eran consideradas por los incas como un manjar. La clase social acomodada la consumía por gusto pero los pobres lo hacían por necesidad por lo que se permitió su consumo a soldados, campesinos y obreros.



Figura 1.7. Planta *Erythroxylon coca*

Las tropas de Hernán Cortés practicaban el coqueo para la ejecución de sus increíbles gestas, aunque parece ser que esta práctica no llegó a extenderse entre los españoles. En 1573 se legaliza el cultivo y tráfico de las hojas de coca, obligando a que el 10% de lo recaudado se entregue como diezmo a la Iglesia. En 1860 Niemann aisla el alcaloide puro, y en 1883 el médico militar Aschenbrandt describe su potencial uso para disminuir la fatiga de los soldados. Sigmund Freud experimenta con la coca y en su obra *Über Coca* propone su uso como antidepresivo en el tratamiento de drogadicciones, y como afrodisíaco. Carl Koller la introdujo en el ejercicio clínico en 1884, como anestésico tópico para operaciones oftalmológicas. La fórmula original de la coca-cola en 1886 contenía cocaína que no se eliminó hasta 1906. A raíz del Convenio de la Haya en 1912 se restringe el empleo de la droga a lo meramente terapéutico. En la década de los ochenta, el consumo de la cocaína se generaliza como forma de cultura.

La cocaína es uno de los psicoestimulantes naturales más potentes que se conocen; actualmente su único uso aceptado en medicina es como anestésico local y vasoconstrictor de vías respiratorias superiores (Pascual y col, 2001).

1.2.3. Antidepresivos

Torres y Escarabajal (2005) refieren que la Psicofarmacología moderna se inicia gracias a unos hechos observados en la práctica clínica psiquiátrica, la investigación farmacológica y los estudios conductuales realizados con animales y seres humanos. Inicialmente se buscaron las indicaciones clínicas de las sustancias sin prestar atención a sus mecanismos de acción; muchos autores mantenían aún la hipótesis de la comunicación eléctrica interneuronal y por ello las primeras pruebas que demostraban la existencia de neurotransmisores en el cerebro no fueron bien acogidas. Por otro lado, tampoco existían teorías coherentes sobre las causas orgánicas de las psicopatologías, lo que impedía comprender cómo los fármacos podían aliviar los síntomas. **Retamal (1998)** menciona que el primer tratamiento eficaz para la depresión es el electroshock, que fue mejorando técnicamente desde la década de los cincuenta.

La depresión es una enfermedad conocida desde los tiempos remotos de la humanidad. Sin embargo, los antidepresivos están disponibles desde hace poco más de 50 años. Hasta ese momento, sólo existían algunas opciones terapéuticas moderadamente eficaces. El opio y la morfina, así como otras terapias comenzaron a aplicarse en los siglos XIX y XX. Durante la primera mitad del siglo XX, cabe destacar la terapia de comas insulínicos, la hidroterapia, la terapia electroconvulsiva o la fototerapia (**Fangmann y Assian, 2007**). Sin embargo, desde 1950 se sintetizaron varios fármacos, divididos en dos grandes grupos: inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) y bloqueadores de la recaptación de aminas biógenas.

Los IMAO fueron la primera generación de antidepresivos, descubiertos en los años cincuenta; bloquean este enzima, que metaboliza la serotonina y norepinefrina, lo que permite que los neurotransmisores aumenten en la sinapsis, incrementando su efecto sobre sus receptores.

La iproniazida, fue el primer IMAO utilizado, pero actualmente estos medicamentos han caído en desuso por sus limitaciones y efectos colaterales.

La historia de los antidepresivos tricíclicos comienza en 1956 cuando sale al mercado la imipramina, con una actividad antidepresiva superior a la de cualquier sustancia conocida hasta la fecha. En 1960 se descubría la amitriptilina y se sintetizaban la clomipramina y la trimipramina, fármacos antidepresivos y sedantes. En 1964 se evidenciaba que los antidepresivos tricíclicos eran capaces de inhibir la recaptación de la noradrenalina, aumentando así su concentración en el espacio sináptico. Un año más tarde, se desarrollaría una hipótesis que resaltaba el papel de la noradrenalina en la aparición de depresiones.

Según **López y Álamo (2006)**, la iproniazida y la imipramina mejoran el humor de los pacientes depresivos, pero fueron desplazados por los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS): fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, escitalopram, sertralina, etc, que actualmente suelen ser los psicofármacos de elección para distintos trastornos. En los años setenta aparecieron los llamados antidepresivos de segunda generación, de potencia similar a los anteriores, pero en general mejor tolerados por su menor actividad anticolinérgica. A este grupo se añadirían los antidepresivos atípicos (trazodona, alprazolam). Comienza una nueva era en los tratamientos psiquiátricos. Los últimos 16 años han sido absolutamente brillantes: “cada año sabemos de algo nuevo, más eficaz ya que con dosis menores obtenemos mejores resultados con menos efectos colaterales”.

1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

1.3.1. Opiáceos

La *morfina* tiene 4 anillos (grupo fenantreno de 4 anillos con 6 carbonos). Su fórmula estructural es $C_{17}H_{19}NO_3$ y su peso molecular es 285,4 g/mol. Se presenta como un polvo blanco cristalino. Tiene un punto de fusión de 254-256°C y su pKa es de 8,0. Es soluble 1 en 5000 partes de agua, 1 en 250 de etanol, 1 en 500 de cloroformo, 1 en 125 de glicerol y prácticamente insoluble en éter. Es posible

encontrarla en forma de sal, ya sea como acetato, clorhidrato, sulfato o tartrato de morfina.

La *heroína* (diacetilmorfina o diamorfina) es sintetizada a partir de la morfina por acetilación en las posiciones 3 y 6. Su fórmula estructural es $C_{21}H_{23}NO_5$ y su peso molecular es 369,4 g/mol. Tiene un punto de fusión de 170°C y su pKa es 7,6. Es rápidamente hidrolizada por álcalis. Se presenta como cristales blancos. Es soluble 1 en 1700 partes de agua, 1 en 31 de etanol, 1 en 1,5 de cloroformo y 1 en 100 de éter. El clorhidrato de heroína es la sal de la droga que presenta un punto de fusión de 229-233°C. Es soluble 1 en 1,6 partes de agua, 1 en 12 de etanol, 1 en 1,6 de cloroformo y prácticamente insoluble en éter.

La *6-acetilmorfina* es el principal metabolito de la heroína. Su fórmula estructural es $C_{19}H_{21}NO_4$ y su peso molecular es 363,8 g/mol. Se presenta en forma de cristales y es soluble en agua.

La *codeína* es un alcaloide que se obtiene del opio o por metilación de la morfina sobre el grupo hidroxilo fenólico. Se observa como un polvo blanco cristalino que fluoresce débilmente y se ve afectado por la luz. Su fórmula estructural es $C_{18}H_{21}NO_3$ y su peso molecular es 299,4 g/mol. Tiene un punto de fusión de 154 a 158°C y su pKa es de 8,2. Es soluble 1 en 120 partes de agua, 1 en 15 de agua caliente, 1 en 2 de etanol, 1 en 0,5 de cloroformo, y 1 en 50 de éter. Se encuentra disponible en forma de sulfato, fosfato o clorhidrato.

La *metadona* (6-dimetilamino-4,4-difenilheptan-3-ona) presenta un único átomo quiral de carbono (C6), por lo que posee 2 estereoisómeros. Su fórmula estructural no presenta relación directa con la morfina, pero asume configuración semejante a ella cuando está en solución, debido a factores estéricos. Así, la metadona simula el anillo piperidínico, que parece ser esencial para la actividad opioide. El clorhidrato de metadona es un cristal incoloro o polvo blanco cristalino, con punto de fusión de 233-236°C y pKa=8,3 (20°C). Es soluble 1 en 12 partes de agua, 1 en 7 de etanol y 1 en 3 de cloroformo y es insoluble en éter (**Moffat y col, 2004**) (**Figura 1.8**).

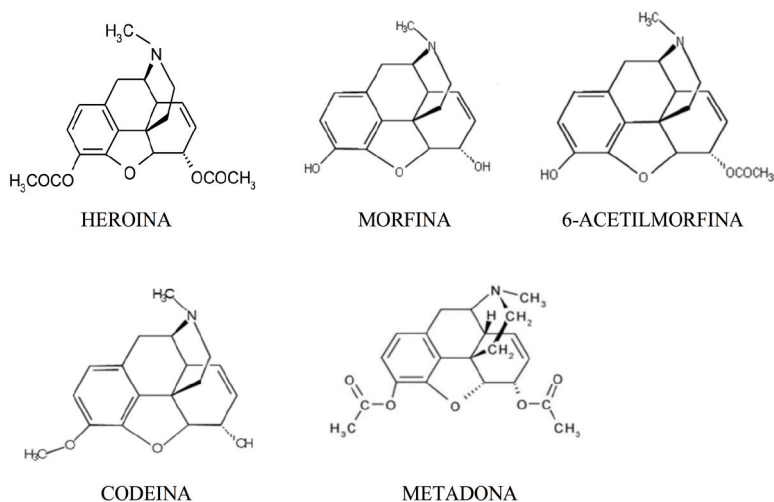


Figura 1.8. Estructuras químicas de los opiáceos estudiados

1.3.2. Cocaína

La *cocaína* es un alcaloide derivado del tropano, es decir, una condensación de los núcleos piperidínico y pirrolidínico. La cocaína es un polvo blanco cristalino, ligeramente volátil, un éster del ácido benzoico y del alcohol complejo 2-carbometoxi-3-hidroxi-tropano. Su fórmula estructural es $C_{17}H_{21}NO_4$ y su peso molecular es 303,4 g/mol. Tiene un punto de fusión de 96-98°C, su pKa es de 8,6 (20°C) (Garret y Seyda, 1983) y es altamente lipofílica. Es soluble 1 en 600 partes de agua, 1 en 7 de etanol, 1 en 0,5 de cloroformo y 1 en 4 de éter.

La *benzoilecgonina* es el principal metabolito de la cocaína. La forma hidratada se presenta en forma de cristales, con un punto de fusión de 86-92°C. La forma anhidra funde a 195°C, con descomposición. Su fórmula estructural es $C_{16}H_{19}NO_4$ y su peso molecular es 289,3 g/mol. Es muy soluble en agua caliente, soluble en etanol, ácidos y bases diluidos, y prácticamente insoluble en éter.

El *cocaetileno* es un metabolito de la cocaína que se forma cuando se consume cocaína y alcohol. Su fórmula estructural es $C_{18}H_{23}NO_4$ y su peso molecular es 317,38 g/mol (Moffat y col, 2004) (Figura 1.9).

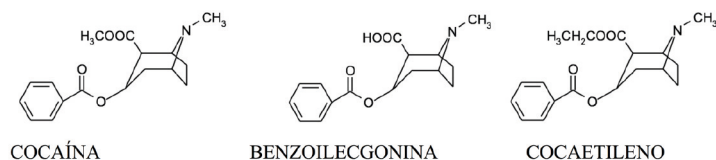


Figura 1.9. Estructuras químicas de la cocaína y metabolitos estudiados

1.3.3. Antidepresivos

La *venlafaxina* es un polvo cristalino de color blanco, soluble en agua, con un punto de fusión de 102-104°C y un pka de 9,4. Tiene un peso molecular de 277,4 g/mol y una fórmula molecular de $C_{17}H_{27}NO_2$. Los nombres comerciales más conocidos son: Vandral® y Dobupal®.

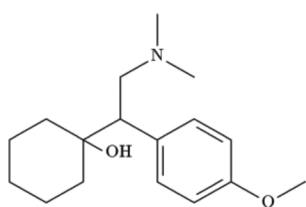
El *escitalopram* es un sólido cristalino de color blanco, escasamente soluble en agua, soluble en etanol (96%), libremente soluble en cloroformo y prácticamente insoluble en éter dietílico. Tiene un punto de fusión de 186°C, un pka de 9,5, un peso molecular de 414,4 g/mol y su fórmula molecular es $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot C_2H_2O_4$. Es el enantiómero S del citalopram. Los nombres comerciales más conocidos son: Ciprallex® y Esertia®.

La *fluvoxamina* es un polvo cristalino blanco, escasamente soluble en agua, libremente soluble en etanol, metanol y cloroformo, y prácticamente insoluble en éter dietílico. Su punto de fusión es de 120-122°C y su pka es 9,16. Tiene un peso molecular de 318,3 g/mol y una fórmula molecular de $C_{15}H_{21}F_3N_2O_3$. Los nombres comerciales más conocidos son: Dumirox® y Luvox®.

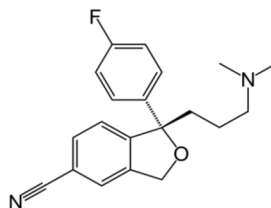
La *fluoxetina* es un sólido cristalino de color blanco, soluble en agua (78,24 mg/L). Su punto de fusión es 179-182°C y su pka es 8,7. Tiene un peso molecular de 309,3 g/mol y una fórmula molecular de $C_{17}H_{18}F_3NO$. Los nombres comerciales más conocidos son: Prozac® y Adofen®.

La *sertralina* es un polvo cristalino blanco con un punto de fusión de 243-245°C y un pka de $9,48 \pm 0,04$ (agua). Su solubilidad en agua es de 3,8 mg/ml (pH 5,3). Es soluble en cloroformo: metanol (1:1), dimetilsulfóxido, etanol y N,N-dimetilformamida, pero es prácticamente insoluble en isopropanol, acetona, acetato de etilo y acetonitrilo. Tiene un peso molecular de 306,2 g/mol y su fórmula molecular es $C_{17}H_{17}Cl_2N$. Los nombres comerciales más conocidos son: Aremis® y Besitran®.

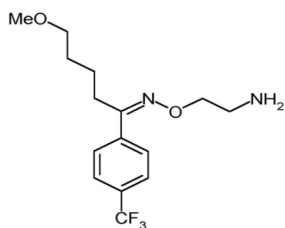
La *mirtazapina* es un polvo cristalino blanco con un punto de fusión de 114-116°C. Es poco soluble en agua. Tiene un peso molecular de 265,4 g/mol y su fórmula molecular es $C_{17}H_{19}N_3$. Los nombres comerciales más conocidos son: Rexer® y Remeron®. (Moffat y col, 2004) (Figura 1.10).



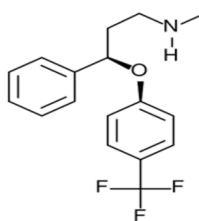
Venlafaxina



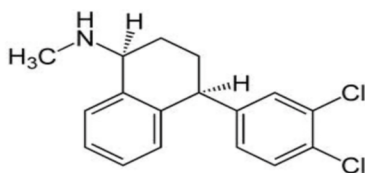
Escitalopram



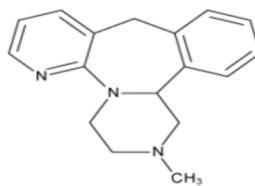
Fluvoxamina



Fluoxetina



Sertralina



Mirtazapina

Figura 1.10. Estructuras químicas de los antidepresivos estudiados

1.4. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLÓGICAS

1.4.1. Opiáceos

Interaccionan con receptores específicos en el SNC, localizados principalmente en el cerebro y en la médula espinal, aunque hay receptores en tejidos periféricos tales como el sistema gastrointestinal. Se cree que los opiáceos simulan la acción de unos péptidos opioides endógenos, analgésicos naturales que incluyen beta- endorfinas, met-enkefalinas y leu-enkefalinas, así como dinorfinas A y B y neo-endorfinas (alfa y beta), y son liberados desde el cerebro para modular el dolor (**Brunton, 2012**).

Cuando los opioides se unen a los receptores específicos en la médula espinal inhiben la liberación de neurotransmisores estimulantes en las fibras nerviosas aferentes que transmiten las señales del dolor a los nervios de la médula espinal. El resultado es un efecto analgésico, cuyo mecanismo bioquímico no es del todo conocido; se facilita la apertura de los canales de iones potasio y se inhibe la apertura de los canales de iones calcio. Hay tres tipos de *receptores* (*mu*, *kappa* y *delta*) según su localización y función, y poseen diferentes afinidades por los opioides (**Way y col, 1998**). La morfina actúa principalmente sobre los receptores *mu*, que son los responsables de las acciones analgésicas (**Figura 1.11**).

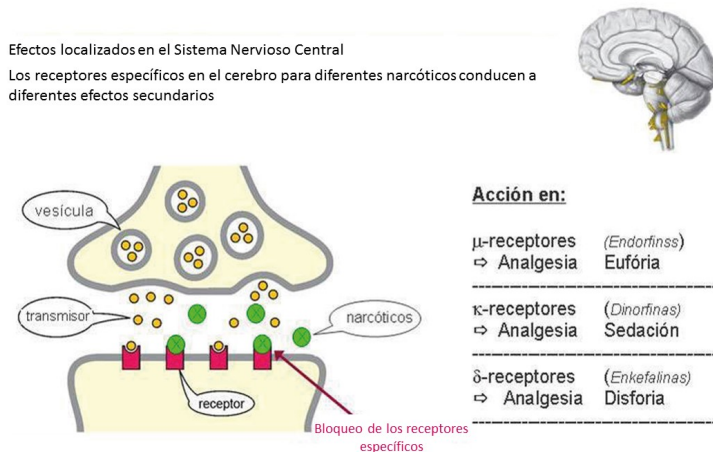


Figura 1.11. Mecanismo de acción de los opiáceos

La mayoría de los opiáceos son agonistas totales o puros sobre estos receptores, que también son responsables de los efectos indeseables de los opiáceos (depresión respiratoria, miosis, reducción de la motilidad gastrointestinal, efectos eufóricos, sedación y dependencia física). Los antagonistas naloxona y naltrexona bloquean los efectos de los agonistas en estos receptores mu y en otros tipos de receptores. Los receptores delta están en el cerebro, en lugares diferentes a los receptores mu, y también son responsables de la analgesia, depresión respiratoria, euforia y dependencia; parecen estar más implicados en el control del dolor periférico. Los receptores kappa se encuentran en la médula espinal y son responsables de la analgesia espinal y sedación. Con la administración crónica se desarrolla tolerancia y dependencia. También la constricción de la pupila es característica en casos de sobredosis y tratamientos largos. A nivel gastrointestinal, provocan una disminución del peristaltismo y dificultad para el vaciamiento gástrico, que causa un estreñimiento que puede ser grave. La morfina también actúa aumentando la liberación de la histamina de los mastocitos. Puede tener poca importancia, dando prurito o dermatitis, o puede ser más grave, dando broncoconstricción o hipotensión. Otro efecto es la inmunodepresión, que ha sido demostrada en animales sometidos a una terapia crónica con opiáceos.

Farmacocinética: La heroína posee una biodisponibilidad por vía oral de sólo un 25% pues presenta una absorción lenta e incompleta y un efecto de primer paso muy importante. Se metaboliza completamente dando morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido, y se excreta un 85% de la dosis en la orina de las primeras 24 horas postconsumo (**Osborne y col, 1990; Jenkins y col, 1994**). En el Reino Unido la heroína fue utilizada como analgésico por vía oral o inyección intravenosa o subcutánea (**Braithwaite y col, 1995**).

La heroína se puede administrar por vía intravenosa, mucosa intranasal (esnifada), vía subcutánea y vía inhalatoria (fumada). En el momento actual, el miedo al contagio por el virus del SIDA ha provocado un aumento espectacular en su consumo por vía intranasal y fumada. Es una prodroga que se hidroliza con rapidez para dar 6-acetilmorfina (6AM), un compuesto liposoluble con una corta vida media y una alta potencia, que a su vez se hidroliza a morfina (**Sawynok, 1986**). Tanto heroína como 6AM son más

liposolubles que la morfina, entran con mayor facilidad en el encéfalo y por lo tanto provocan un inicio de acción más rápido. Las vidas medias de eliminación son 3, 10 y 120 minutos, respectivamente, por lo que es prácticamente imposible la detección de la primera en fluidos biológicos. Por esto, la confirmación del consumo de heroína, se realiza mediante la detección de sus metabolitos, morfina y/o 6AM (**Figura 1.12**).

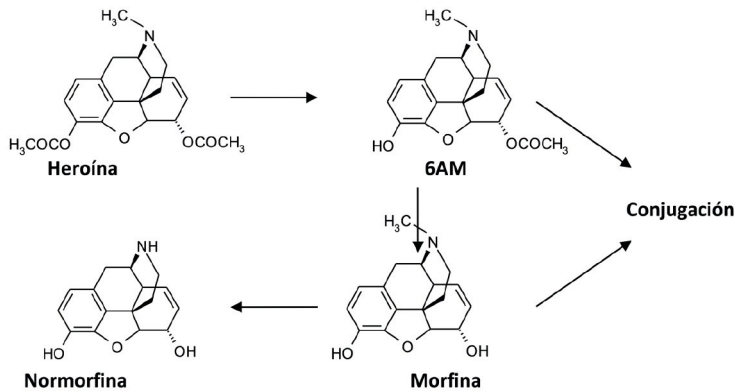


Figura 1.12. Metabolismo de la heroína.

A diferencia de la morfina, la codeína es aproximadamente un 60% más eficaz por vía oral que por vía parenteral. A continuación se muestra su metabolismo (**Figura 1.13**).

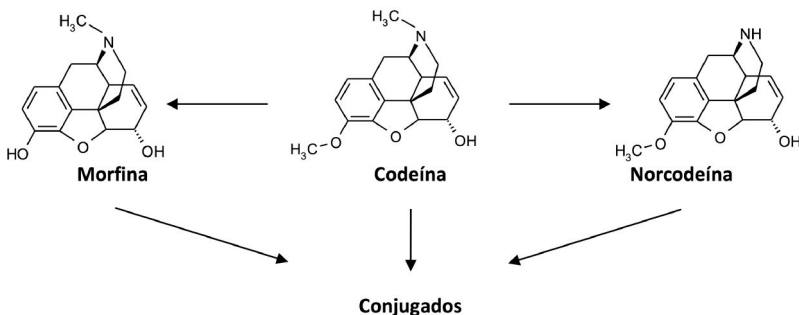


Figura 1.13. Metabolismo de la codeína.

La metadona se absorbe rápidamente después de su administración oral. El inicio de su acción se observa de 30 min a 4 h después de la dosis y dura unas 24 horas. Su biodisponibilidad es del 80-90% y la concentración plasmática máxima se alcanza a las 2-4 horas post-consumo. Se fija a proteínas plasmáticas en un 71-88% y el volumen de distribución es de 3,6 L/kg. Atraviesa la placenta, y la concentración en líquido amniótico es similar a la del plasma materno. El principal metabolito es un derivado N-desmetilado (EDDP), que se excreta por orina y carece de actividad farmacológica. Tras una dosis oral única, el 21% del fármaco se excreta de forma inalterada por orina, siendo la vida media de eliminación 12-24 h en la fase inicial y 55 h en la fase terminal. Tras administración oral repetida, la vida media de eliminación es de 22-31 h, con una gran variabilidad interindividual, ya que depende del pH urinario (a pH básico la vida media puede duplicarse) (**Figura 1.14**).

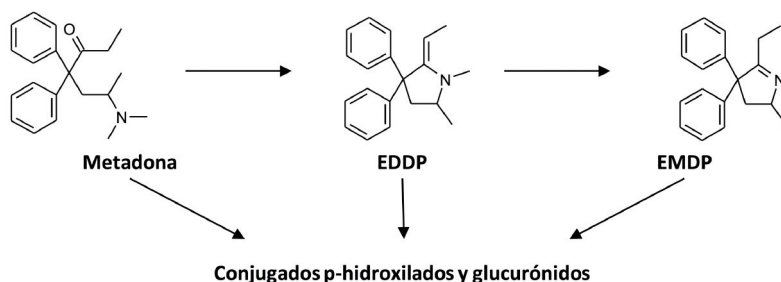


Figura 1.14. Metabolismo de la metadona.

Toxicidad: La morfina puede dar intoxicaciones en recién nacidos, por no estar completamente formada la barrera hematoencefálica. En el adulto no hay tantos problemas, pero pueden aparecer síntomas, como depresión respiratoria importante, náuseas y vómitos, problemas de tránsito intestinal e hipotensión. En caso de sobredosis, se observan convulsiones, coma y muerte por depresión respiratoria. La heroína es 2-3 veces más potente que la morfina, con una dosis letal oral de 200

mg, aunque los adictos pueden tolerar hasta 10 veces más y también se conocen casos de muerte tras el consumo de una dosis de 10 mg; esto dificulta la interpretación de los niveles sanguíneos de morfina y 6AM, ambos metabolitos de la heroína (**Potsch y col, 1999, Westerling y col, 1998**).

Los programas de mantenimiento con metadona (PMMs) para sujetos adictos a la heroína han conseguido buenos resultados; se disminuye el riesgo relativo de muerte del heroínómano en unas 3-4 veces, cuando se administra una dosis de metadona de 90 mg/día y se obtiene una concentración plasmática de 100 ng/mL (**Lorimer y Schmid, 1994**). Sin embargo, se ha observado un mayor riesgo de muerte en la primera etapa de los PMMs (**Drummer y col, 1990; Drummer y col, 1992; Caplehorn y Drummer, 1999; Clark y col, 1995**) sobre todo en consumidores ocasionales de heroína, aún no tolerantes, para los cuales dosis de metadona tan bajas como 20 mg pueden resultar fatales al cabo de pocos días de tratamiento, debido a la acumulación de droga en sangre y tejidos. Además el uso incontrolado de metadona es todavía más peligroso que el de heroína, por su elevada vida media. Los niveles sanguíneos de metadona se encuentran entre 0,1 y 1 mg/L, sin poder distinguir entre valores terapéuticos y tóxicos, como sucede con la morfina. Los signos patológicos de toxicidad por metadona son similares a los de otros opiáceos; se da depresión respiratoria e hipoxia asociada, hepatitis C y bronconeumonía.

1.4.2. Cocaína

La cocaína es un poderoso estimulante del sistema nervioso que acelera el ritmo cardíaco, dilata las pupilas, aumenta la temperatura y la presión arterial. Estos cambios físicos pueden estar acompañados por convulsiones, euforia, paro cardíaco, paro respiratorio y/o derrames. La cocaína llega al cerebro en segundos, produciendo una rápida e intensa excitación; sin embargo, la euforia desaparece rápidamente, dejando al adicto con un enorme deseo de consumirla en forma repetida. Para satisfacer este deseo el consumidor incrementa la dosis y la frecuencia, lo que produce adicción y debilitamiento físico. Es destacable la interacción metabólica que se produce cuando se toman conjuntamente

cocaína y alcohol. Los consumidores de cocaína, al ingerir alcohol, realzan la euforia y reducen la irritabilidad experimentada durante el consumo intenso del alcaloide. Esto se fundamenta en la transformación, por enzimas hepáticas, de la cocaína en cocaetileno, ambos equipotentes para bloquear la recaptación de la dopamina.

La cocaína es además un anestésico, que inhibe la transmisión nerviosa porque bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje, impidiendo la entrada de Na^+ en respuesta a la despolarización y la conducción nerviosa. Esto puede ser peligroso en casos de sobredosis cuando se afecta la conducción muscular en el corazón, causando arritmias cardíacas que pueden llevar a una muerte súbita. El repentino “rush” o “high” con inyecciones iv o fumando cocaína es causado por la liberación repentina de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas; es un efecto similar al “rush” de la adrenalina en determinados estados fisiológicos: orgasmo sexual, nerviosismo en eventos atléticos o hablar en público (Klaasen, 2013) (Figura 1.15).

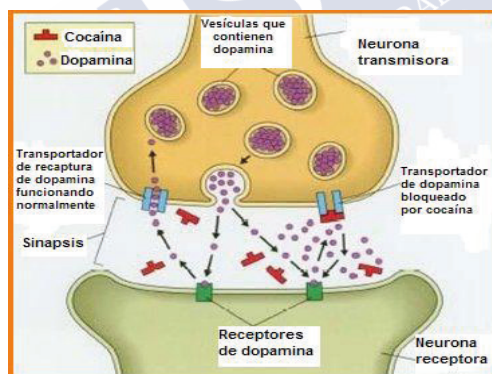


Figura 1.15. Mecanismo de acción dopaminérgico de la cocaína

Farmacocinética: Fumada o administrada por vía intravenosa, produce sus efectos en segundos y alcanza la concentración plasmática máxima a los 2-5 min (Cone, 1995). Por vía intranasal la cocaína es casi completamente absorbida pero la concentración plasmática máxima se

alcanza a los 30 min. La biodisponibilidad oral es baja (30%). Se distribuye ampliamente, con un volumen de distribución de 2 L/kg, y pasa la barrera placentaria.

Los principales metabolitos son la benzoilecgonina (BEG) y la ecgonina metil éster (EME), ambos inactivos. El metabolismo a EME se debe a esterasas hepáticas y plasmáticas (pseudocolinesterasas), y la BEG se forma por hidrólisis espontánea y por una carboxilesterasa hepática. En presencia de etanol, la carboxilesterasa transforma la cocaína en cocaetileno, con una actividad cardiotoxica importante (**Benowitz, 1993; Boyer y Petersen, 1992**). Sólo un 1-5% de la dosis se elimina sin transformar en orina, la BEG y la EME son los metabolitos mayoritarios en orina y se pueden detectar durante 48-72 horas. La vida media de la cocaína oscila entre 40 min y 4 h, según la dosis, vía de entrada y duración del consumo (**Jeffcoat y col, 1989**) (**Figura 1.16**).

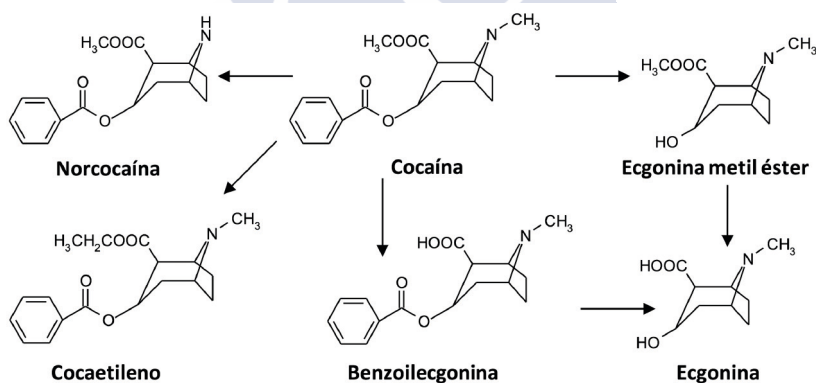


Figura 1.16. Metabolismo de la cocaína.

Toxicidad: Dosis de 50-100 mg intranasales o 15-30 mg intravenosos producen euforia. Dosis intranasales u orales de 0,5-1 g pueden ser letales, pero se han descrito casos de muerte tras el consumo de 20 mg intranasales. La dosis letal de cocaína disminuye en presencia de alcohol, posiblemente por la presencia de mayores concentraciones plasmáticas de cocaína y la aparición de cocaetileno. La cocaína es una

droga tóxica y los consumidores presentan paranoia, comportamiento violento, hipertermia y colapso repentino, además de cambios patológicos en diferentes órganos y daños cardiovasculares en adictos jóvenes (**Karch, 1991**). El uso de cocaína es un factor de riesgo significativo para hemorragias cerebrales fatales (**Nolte y col, 1996; Morrow y McQuillen, 1993**). Se han dado varios casos de rabdomiolisis asociada con abuso de cocaína, incluyendo hiperpirexia y fallo renal agudo. A veces, la presencia de cocaína en sangre puede ser prolongada si el aclaramiento renal está disminuido (**Nolte, 1991**).

No hay concentraciones de cocaína y metabolitos que puedan explicar una muerte por esta droga; también se deben tener en cuenta otros factores como la administración de otras sustancias tóxicas, las circunstancias de la muerte y los hallazgos patológicos y toxicológicos (**Karch y col, 1998**). En un estudio realizado en Nueva York, la mayoría de las muertes estaban asociadas a cocaína+heroína (39%) o cocaína+alcohol (36%), encontrándose 6 personas que murieron por eventos cardíacos agudos relacionados directamente con la cocaína y 9 casos de hemorragia cerebral.

1.4.3. Antidepresivos

La depresión se caracteriza por: abatimiento y desgana, pérdida de interés por el mundo externo, disminución de la capacidad de experimentar placer, trastornos funcionales y del sueño, pensamiento lento y hasta una vivencia delirante de ruina y necesidad de castigo (**Rojtenberg, 2001**). Se pueden diferenciar dos tipos de síndrome depresivo: la depresión unipolar, en la que las oscilaciones del estado de ánimo se producen siempre en la misma dirección, y el trastorno bipolar, en el que la depresión alterna con la manía. En muchos aspectos la manía es opuesta a la depresión, con entusiasmo exagerado y exceso de confianza en sí mismo, acompañados de acciones impulsivas.

La acción sedante se ha asociado tradicionalmente al bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos histamínicos (H1) centrales. Los efectos anticolinérgicos se deben al bloqueo muscarínico, por lo que provocarán sequedad de boca, retención urinaria, estreñimiento y visión borrosa, en función de la dosis, la edad y la susceptibilidad del paciente.

El síndrome anticolinérgico central cursa con desorientación, delirios y alucinaciones.

La hipotensión postural y la producción de arritmias pueden limitar gravemente el uso de antidepresivos, sobre todo en pacientes con trastornos cardíacos. Son preferibles en estos casos los bloqueadores selectivos de recaptación de serotonina o los nuevos antidepresivos, con efectos cardiovasculares menos graves.

La principal teoría bioquímica acerca de la depresión es la hipótesis monoaminérgica (**Figura 1.17**), que habla de una deficiencia funcional de los transmisores monoaminérgicos en determinadas regiones del encéfalo. La hipótesis se formuló inicialmente en relación con la noradrenalina, pero trabajos posteriores demostraron la implicación de la 5-hidroxitriptamina ó serotonina; esto conduciría a un incremento de estas aminas en el espacio sináptico, gracias a lo cual se produciría el efecto antidepresivo (**Rang y col, 2012**).

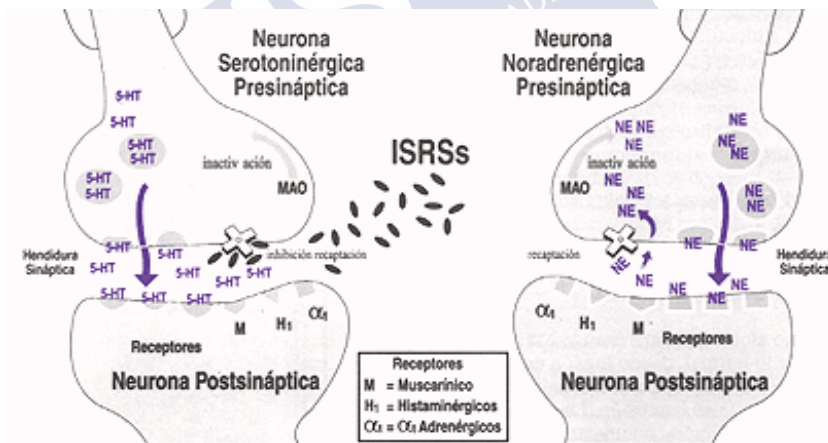


Figura 1.17. Hipótesis monoaminérgica para antidepresivos

La mayoría de los antidepresivos no modifica el estado de ánimo en individuos sanos. En general, no producen efectos euforizantes y por consiguiente, no son fármacos que pueden crear adicción. En pacientes depresivos

deben transcurrir al menos 10-15 días de tratamiento para que empiece a manifestarse el efecto antidepresivo, dato que dificulta la comprensión de los mecanismos bioquímicos. La **Tabla 1.2** muestra la clasificación de los fármacos estudiados, según su mecanismo de acción.

Tabla 1.2. Clasificación de los antidepresivos estudiados, según su mecanismo de acción

MECANISMO DE ACCIÓN		PRINCIPALES ATD
Inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina	Selectivos (IRSN)	venlafaxina
Inhibición selectiva de la recaptación de serotonina (ISRS)		fluoxetina, fluvoxamina, escitalopram, sertralina
Antagonismo de receptores de serotonina y noradrenalina		mirtazapina

Los IRSN se caracterizan por tener propiedades inhibitorias de la recaptación de serotonina, noradrenalina y en menor medida, de dopamina. Su eficacia relativa depende de la dosis: dosis terapéuticas bajas muestran una selectividad por el lugar de recaptación de serotonina; dosis intermedias bloquean lugares de recaptación de noradrenalina y serotonina; y dosis altas bloquean la recaptación de dopamina, además de la recaptación de serotonina y noradrenalina. El primer fármaco de este nuevo grupo, aprobado por la **FDA** (*Food and Drug Administration, 2001*) para el tratamiento de la depresión ha sido la venlafaxina.

Los ISRS son estructuralmente diferentes entre sí y no tienen prácticamente efectos inhibitorios en los receptores histaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos o colinérgicos. Estos fármacos se desarrollaron para evitar los molestos efectos secundarios de los antidepresivos tricíclicos (**Salazar y col, 2005**).

Farmacocinética: La absorción de los antidepresivos por vía oral es rápida y su unión a la albúmina plasmática es fuerte. Sólo un 5-30% de la concentración plasmática se corresponde con la fracción libre de la mayoría de estos fármacos; el resto se encuentra unido a dicha proteína. Los ATD son altamente liposolubles (**Mendoza Patiño, 2008**), lo que justifica

unos volúmenes de distribución elevados (en general, 10-50 L/Kg) y una eliminación lenta, tal y como lo demuestran sus vidas medias que pueden llegar hasta 4-6 días. Este secuestro extravascular, junto con la fuerte unión a la albúmina plasmática, justifica que la hemodiálisis no resulte eficaz para aumentar su eliminación. Los ATD se metabolizan en el hígado a través de N-desmetilación e hidroxilación del anillo, dando lugar a metabolitos que suelen retener la actividad biológica. Los antidepresivos se inactivan mediante conjugación glucurónida de los metabolitos hidroxilados, lo que facilita su excreción urinaria. También una pequeña porción de la dosis puede ser excretada por heces y/o leche materna (**Rang y col, 2012**).

En la **Tabla 1.3** se pueden ver las diferentes características farmacocinéticas y la dosificación de los antidepresivos (**Govantes y col, 2009**).

Tabla 1.3. Parámetros farmacocinéticos y dosificación de los antidepresivos

	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Sertralina	Fluoxetina	Mirtazapina
Concentrac Terapéutica (µg/L)	250-750	20-200	50-250	50-500	150-500	≤100
Concentrac Tóxica	1 mg/L	500 µg/L (letal)	160 µg/L	2930 µg/L (1 caso)	1,3-6,8 mg/L	>100 µg/L
Biodispon (%)	12	80	94	80	80	50
Vida media (h)	5	30	15-22	25	72-120	20-40
V distribuc (L/kg)	6,8	12-16	25	20	27	--
Clearance	1,2-1,7 L/Kg/h	0,08-0,33 L/min	3 L/min (oral) 1,5 L/min	--	0,6 L/Kg/h	31 L/h
Unión pp (%)	27	71	70	>95	>95	85
Dosis usual (mg/día)	25-225	10	100-200	100-150	20-40	15-45
Dosis tóxica (mg/día)	75-375	10-40	>200	>150	>40	>45

Toxicidad: Dada la tendencia al suicidio de los enfermos depresivos, la frecuencia de intoxicaciones por sobredosificación es elevada, por lo que es conveniente que el paciente grave no disponga libremente de grandes cantidades de antidepresivo. Por ser sustancias inhibidoras de la recaptación de noradrenalina, potencian las acciones farmacológicas de esta amina biógena. Sin embargo, bloquean la acción de compuestos que para ejercer sus efectos farmacológicos deben incorporarse a la terminación presináptica utilizando el mismo mecanismo de transporte que la noradrenalina (**Del Rio y Flórez, 2005**).

La intoxicación se caracteriza por alteraciones cardiovasculares (taquicardia, bradicardia e hipotensión), convulsiones, trastornos gastrointestinales y hepáticos, convulsiones, agitación y somnolencia. Los casos de muerte son raros y en caso de sobredosis se debe considerar la ingesta de otras sustancias tóxicas. Entre las reacciones adversas asociadas a su uso terapéutico, destacan: náuseas, vómitos, sequedad de boca, estreñimiento, anorexia, insomnio, vértigo, nerviosismo, orgasmo o eyaculación anormal, visión borrosa, taquicardia y temblores. El tratamiento debe ser sintomático y de apoyo (**Salazar y col, 2004**)

1.5. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1.5.1. Plasma

Una persona adulta tiene un promedio de 5 litros de sangre, que supone un 8% del peso corporal. El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre, transporta glóbulos y plaquetas, y contiene 91% de agua, lípidos, proteínas (albúminas, globulinas y fibrinógeno), sustancias inorgánicas (sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato) y sustancias de transporte (glucosa, aminoácidos, nitrógeno, oxígeno, urea, ácido úrico, etc). El suero sanguíneo es la fracción fluida que queda cuando se coagula la sangre.

Los glóbulos rojos son células formadas en la médula, que carecen de núcleo y contienen hemoglobina, capaz de transportar oxígeno a los tejidos. El ser humano cuenta con 4,5-5,5 millones por mm^3 de sangre, que constituyen el 45% del volumen de la sangre. Los glóbulos blancos poseen núcleo y son los encargados de destruir los agentes infecciosos y las células infectadas. El conteo normal es de 4.500-11.500 por mm^3 de sangre, variable según las

condiciones fisiológicas y patológicas. Existen dos tipos principales: granulocitos que son los neutrófilos, basófilos y eosinófilos, y agranulocitos que son los monocitos y linfocitos. Las plaquetas son fragmentos celulares pequeños sin núcleo que se producen en la médula ósea. Su valor normal es 150.000-450.000 por mm³ de sangre; contribuyen a la formación de los coágulos, siendo así las responsables del cierre de las heridas vasculares (**Hall, 2011; Nelson y Cox, 2014**).

La fisiología de la sangre está relacionada con los elementos que la componen y con los vasos que la transportan:

- transporta el oxígeno desde los pulmones al resto del organismo
- transporta el CO₂ desde todas las células del cuerpo hasta los pulmones
- transporta los nutrientes contenidos en el plasma sanguíneo desde el hígado
- transporta mensajeros químicos como las hormonas
- defiende el cuerpo de las infecciones, gracias a los leucocitos
- responde a las lesiones que producen inflamación por algunos leucocitos y otras células
- coagulación de la sangre y hemostasia, gracias a las plaquetas y factores de coagulación
- rechaza el trasplante de órganos ajenos y alergias, como respuesta del sistema inmunitario
- homeostasis en el transporte del líquido extracelular, es decir, en el líquido intravascular

La mayor parte de los xenobióticos orgánicos van disueltos en el plasma o unidos a las proteínas y lipoproteínas séricas; sólo algunos son transportados por los hematíes. Por ello, el plasma es la muestra más representativa porque además posee menos interferencias y pigmentos que la sangre, evitando así la formación de emulsiones con los disolventes orgánicos como sucede frecuentemente con la sangre total. La concentración total de una droga en plasma varía con la concentración de proteínas (**Moffat y col, 2004**). Lo ideal es que el laboratorio reciba sangre total, sin coagular y sin hemolizar, adicionada con fluoruro sódico (5 mg/mL) que impide la coagulación y evita la fermentación y putrefacción; el analista decidirá si utiliza la sangre total o la centrifuga para separar el plasma y trabajar con él (**Repetto y Repetto, 2009**).

Las muestras de sangre postmortem suelen estar hemolizadas y putrefactas pero son las únicas disponibles, por eso se debe agitar la muestra vigorosamente para conseguir una mezcla homogénea, antes de tomar una alícuota para el análisis. Para romper o disolver los coágulos puede aplicarse un tratamiento con ultrasonidos. Se deberían tomar dos muestras de sangre: una del corazón y otra de un lugar periférico (venas yugular o femoral) porque la sangre cardíaca puede estar contaminada, bien por un trauma, bien por la liberación de drogas desde los tejidos.

Estudios clínicos y postmortem demuestran que las concentraciones terapéuticas, tóxicas y letales de las drogas de abuso pueden solaparse. La tolerancia y la sensibilización juegan un papel significativo en la pobre correlación entre los niveles plasmáticos encontrados y la gravedad de la intoxicación (Levine, 1999).

1.5.2. Fluido oral

Está constituido por secreciones procedentes de glándulas submandibulares (65%), parótidas (23%), sublinguales (4%) y otras pequeñas glándulas bucales y labiales (8%). También contiene células epiteliales, restos de comida y microorganismos orales (Ritschel y Thompson, 1983). Bajo estimulación, especialmente por la masticación, la contribución de las parótidas aumenta hasta en un 50% del total del fluido oral producido (Haeckel y Hänecke, 1996; Mulamed, 1993).

El fluido oral ó saliva es un ultrafiltrado del fluido intersticial, con un pH de 5,8-7,6, que contiene: agua (99%), en la que se disuelve el 1% restante: iones, moco, lisozima, mucina y otras sustancias como transferrinas. La baja concentración de proteínas en fluido oral, comparada con la sangre, explica que la mayor proporción de la droga contenida en este fluido no esté unida a proteínas. La unidad básica de las glándulas salivares es el salivón, que está formado por ácinos conectados por conductos, y el fluido oral es secretado a la cavidad bucal. Los ácinos son sacos que producen una secreción primaria semejante a un ultrafiltrado de plasma. Los conductos salivares modifican la secreción primaria: se agrega bicarbonato y potasio, y se reabsorbe cloruro y sodio. Cuando hay abundante secreción salivar, aumenta la concentración de iones sodio, cloruro y bicarbonato, y desciende la concentración normal de potasio en fluido oral.

El sistema nervioso autónomo juega un papel importante en el volumen, viscosidad y concentración proteica del fluido oral secretado (**Aps y Martens**, 2005). La velocidad de secreción depende de la estimulación, la hora del día y el ritmo circadiano y varía desde 0 mL/min (durante el sueño) a 6 mL/min (estímulo ácido en lengua), pudiendo producirse 1-2 L de fluido oral por día. La mayoría de las sustancias atraviesan las membranas lipídicas de las células acinares por difusión pasiva, que depende del gradiente de concentraciones y del pK de la droga, entre otros factores.

Sustancias de bajo peso molecular son excretadas activamente en el fluido oral, por tanto su concentración puede ser mucho mayor que en sangre. Moléculas polares pequeñas pasan al fluido oral por un proceso de ultrafiltración, a través de los poros de las membranas. Varios autores (**Moolchan y col, 2000; Jenkins y col, 1995**) estudiaron los niveles de cocaína y/o heroína con sus metabolitos en plasma y fluido oral sin poder llegar a una correlación estable entre ellos. Por el contrario, otros autores sí afirmaron encontrar niveles en fluido oral similares a los sanguíneos (**Toennes y col, 2005; Speckl y col, 1999**). La **Tabla 1.4** recoge algunos valores de la relación entre las concentraciones de droga en saliva y plasma, en base a los hallazgos publicados por diferentes autores.

Tabla 1.4: Relación de concentración saliva/plasma de opiáceos y cocaína

Droga de abuso	Relación Saliva/Plasma	Referencia
Morfina	0,2 0,1-3,5	Cone, 1990 Röhrich y col, 1997
Codeína	1,0 3,0 2,0-6,6	Cone, 1990 Sharp y col, 1983 Röhrich y col, 1997
Heroína	0,02-0,9	Röhrich y col, 1997
Cocaína	1,0-2,0 0,36-9,74 1,3-10,1	Cone y col, 1988 Röhrich y col, 1997 Cone y col, 1997
Benzoilecgonina	0,2 0,1-63,7	Röhrich y col, 1997 Cone y col, 1997

La interpretación de los niveles de drogas en fluido oral depende de varios factores:

- El pH del fluido oral es normalmente más ácido que el de la sangre, pero la estimulación de la secreción salivar produce un aumento del pH hasta un máximo de 8,0 (**Kidwell y Holland, 1998**). Esta condición puede alterar la relación fluido oral/plasma para sustancias altamente ionizadas a pH fisiológico.
- Para ácidos débiles con $pka > 8,5$, bases débiles con $pka < 5,5$ y sustancias neutras, la relación fluido oral/plasma es independiente del pH. Para bases débiles con $pka > 5,5$ y ácidos débiles con $pka < 8,5$, el pH del fluido oral podría tener efecto sobre la concentración (**Haeckel y Hänecke, 1996; Cone y Menchen, 1988**).

1.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

La extracción de los analitos a partir de la muestra, también llamada “*preparación de la muestra*”, se basa en el aislamiento y enriquecimiento de los compuestos de interés a partir de la matriz biológica para su posterior determinación. En esta tesis doctoral, se han usado tres procedimientos de extracción diferentes: extracción en fase sólida (SPE) para separar drogas de abuso del plasma; extracción líquido-líquido (LLE) para separar drogas de abuso de la saliva y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para separar antidepresivos del plasma. La técnica analítica usada para la determinación de las drogas de abuso y/o los antidepresivos en plasma y/o saliva es la cromatografía líquida de alta y/o ultra resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-PDA y/o UPLC-PDA) o a un detector de espectrometría de masas (MS-MS).

1.6.1. Extracción en fase sólida (SPE)

La preparación de la muestra puede ser de igual o mayor importancia que otros factores a la hora de mejorar los resultados obtenidos con los métodos analíticos. Su optimización implica una disminución en el número de etapas y sus errores asociados; se pueden reducir volúmenes de muestra y de disolvente, tiempo de extracción y cantidad de residuos tóxicos generados. La extracción en fase sólida (SPE) fue introducida en los años setenta, como una alternativa a la extracción

líquido-líquido, para eliminar interferencias procedentes de la matriz biológica y concentrar el analito antes de su determinación. Se comprobó que los beneficios de la SPE sobre la LLE eran una mayor recuperación de algunos analitos, así como un incremento en la selectividad y velocidad. Actualmente están disponibles un gran número de materiales adsorbentes, según el tipo de extracción: en fase normal, en fase reversa, de intercambio iónico, etc., aunque no ha habido mejoras sustanciales en la tecnología fundamental utilizada. Problemas asociados con el diseño de sus cartuchos incluyen un equilibrio entre maximizar la capacidad de extracción de la columna y minimizar el volumen de eluyente requerido, conseguir una buena reproducibilidad y eliminar impurezas de la muestra que pudieran interferir en el análisis posterior.

En SPE hay que tener en cuenta, además del adsorbente y su tamaño de partícula, la elección adecuada del disolvente (idealmente debe eluir de forma selectiva los analitos, y además ser compatible con la técnica analítica utilizada en la etapa de medida) y su velocidad de flujo. En un proceso de extracción en fase sólida, se pueden distinguir cuatro etapas básicas (**Moors y col, 1994; Thurmann y Mills, 1998**):

-*Acondicionamiento del adsorbente*: se utiliza uno o varios disolventes que eliminen posibles impurezas existentes sobre la superficie del material y que faciliten la interacción entre éste y la muestra en la que se encuentra el analito a concentrar.

-*Adición de la muestra*: durante esta etapa el analito se concentra hasta 1000 veces; además algunos de los componentes de la matriz pueden quedar también retenidos.

-*Lavado*: el adsorbente se lava con un disolvente adecuado para eliminar las interferencias retenidas, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente; si la muestra es acuosa, puede usarse un tampón acuoso o una mezcla agua/disolvente orgánico.

-*Elución del analito*: durante esta etapa, se recupera el analito de la fase sólida por adición de un disolvente adecuado capaz de romper las uniones analito-adsorbente; se suele usar un disolvente orgánico que puede ser inmiscible con la matriz acuosa, por lo que es conveniente realizar un paso previo de secado, conectando el vacío durante unos minutos (**Figura 1.18**).



Figura 1.18. Fotografía del sistema SPE usado

1.6.2. Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido convencional se basa en la transferencia del analito desde la muestra acuosa a un disolvente o mezcla de disolventes orgánicos inmiscibles en la matriz acuosa. Así se consigue separar la sustancia, para su posterior identificación y determinación usando frecuentemente técnicas cromatográficas con diferentes detectores. Aunque es una técnica ampliamente utilizada, presenta algunas deficiencias, tales como la formación de emulsiones y el uso de grandes volúmenes de muestra y de disolventes tóxicos, que hacen que la LLE sea costosa, larga y poco amigable con el medio ambiente.

La utilización de Toxítubos® (**Figura 1.19**) simplifica el procedimiento de extracción líquido-líquido para drogas básicas como las drogas de abuso (Toxítubos A) y drogas ácidas (Toxítubos B) a partir de una matriz biológica (sangre, orina, humor vítreo o saliva). Es un método muy usado en Toxicología forense tanto para sangre total o plasma como para orina porque posee una serie de ventajas: es económico pues no utiliza disolventes adicionales, no requiere de un equipo especial dotado de vacío como en la SPE, es rápido, poco laborioso y permite la obtención de cromatogramas muy limpios (**Cámpora y col, 2003 y 2006; Strano-Rossi y col, 2011; Fernández y col, 2008**). Cada Toxítubo A contiene varias sales (cloruro sódico-1,53 g, bicarbonato sódico-0,14 g, carbonato sódico-0,14 g) y una mezcla de disolventes

(heptano-0,77 mL, isopropanol-0,38 mL, 1,2-dicloroetano-0,58 mL y diclorometano-0,58 mL). En total, 1,81 g de sales y 2,31 mL de disolventes orgánicos.



Figura 1.19. Fotografía de los Toxitubos usados

1.6.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Se han hecho esfuerzos importantes en las dos últimas décadas para adaptar los métodos tradicionales de preparación de la muestra y desarrollar nuevos enfoques para ahorrar tiempo, mano de obra y material. La miniaturización ha sido clave en la consecución de estos objetivos.

La Microextracción en fase sólida (SPME) fue la primera técnica de microextracción en química analítica (**Pawliszyn y Liu, 1987; Arthur y Pawliszyn, 1990**); analitos de polaridad baja o media son extraídos de muestras acuosas en una fibra polimérica sólida por difusión pasiva. Se trata de un método relativamente rápido, fácil de usar y acoplable en línea a la instrumentación analítica; sin embargo, las fibras recubiertas son generalmente caras, y tienen una vida limitada para algunas aplicaciones.

La Microextracción en fase líquida (LPME) surgió a mediados de la década de los noventa. Como su nombre indica, sólo se necesitan microlitros de disolvente para extraer los analitos de la muestra acuosa. Supera muchas desventajas de la LLE y algunas de la SPME, por ejemplo, la dependencia de un proveedor comercial, el arrastre de la muestra o la contaminación cruzada (**Djozan y col, 2001**).

La *Microextracción líquido-líquido dispersiva* (DLLME) fue presentada unos años después por **Rezaee y col (2006)**, y se basa en un sistema ternario de disolventes: la *muestra acuosa*, unos pocos microlitros de un *disolvente extractante* con alta densidad (clorobenceno, cloroformo o disulfuro de carbono) y un *disolvente dispersante* altamente miscible con las otras dos fases (metanol, acetonitrilo o acetona). La **Figura 1.20** muestra la jeringuilla y los tubos usados en DLLME.

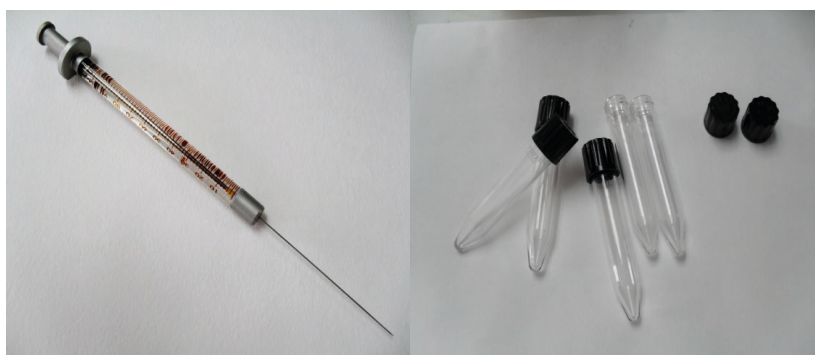


Figura 1.20. Fotografías de la jeringuilla y tubos usados en DLLME

Esta técnica incluye dos pasos: en el primero, la mezcla de las fases extractante y dispersante es inyectada rápidamente en la muestra acuosa, produciéndose una importante turbulencia, con la consiguiente formación de gotas muy finas en la muestra donde los analitos se encuentran enriquecidos. Debido a la gran superficie de contacto existente entre el extractante y la muestra acuosa se alcanza el equilibrio rápidamente y por lo tanto el tiempo de extracción es muy corto (**Rezaee y col, 2010; Zgota-Grzésekowiak, 2010**). El segundo paso consiste en la centrifugación de la disolución turbia, formándose una fase sedimentada que se deposita en el fondo del tubo cónico; esta gota se concentra y finalmente se procede a su determinación analítica (**Figura 1.21**). En base a lo comentado, las ventajas de la DLLME incluyen rapidez, simplicidad, bajo coste, alta recuperación, alto factor de enriquecimiento y no agresión al medio ambiente.

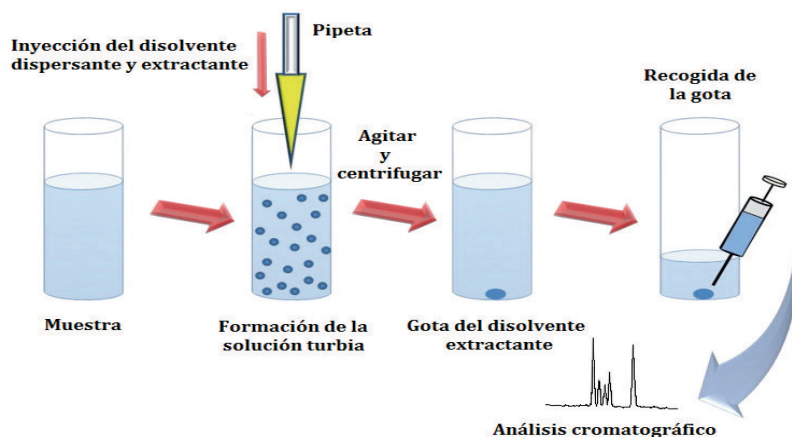


Figura 1.21. Fases de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Los factores que afectan a la eficacia de la DLLME son: disolvente extractante adecuado; disolvente dispersante adecuado; volumen de disolvente extractante y volumen de disolvente dispersante.

(1) Los disolventes extractantes son seleccionados en base a su mayor densidad con respecto al agua, su capacidad de extracción de los compuestos de interés y su buen comportamiento cromatográfico. Hidrocarburos halogenados como el clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno son por lo general seleccionados como disolventes extractantes, por cumplir estas características.

(2) La miscibilidad del disolvente dispersante, tanto en el disolvente extractante como en la fase acuosa es esencial para la selección del mismo. Acetona, metanol y acetonitrilo suelen ser seleccionados como disolventes dispersantes.

(3) El volumen de disolvente extractante tiene un efecto importante en el factor de preconcentración (PF), que es el cociente entre la concentración del analito en la fase sedimentada y la concentración inicial de analito en la muestra. Al aumentar el volumen del extractante, el volumen de la fase sedimentada, obtenida por centrifugación, aumenta, resultando en una disminución del PF. Por lo tanto, el volumen óptimo de disolvente extractante debe garantizar altos valores

de PF y volumen suficiente de la fase sedimentada para el análisis posterior de la muestra.

(4) El volumen de disolvente dispersante afecta directamente a la formación de la disolución turbia (agua / disolvente dispersante o disolvente extractante), al grado de dispersión del disolvente extractante en la fase acuosa y posteriormente a la eficacia de la extracción. La variación del volumen de dispersante cambia el volumen de la fase sedimentada, por lo tanto, es necesario cambiar el volumen de disolvente dispersante y disolvente extractante simultáneamente para alcanzar un volumen constante de fase sedimentada. El volumen adecuado de disolvente dispersante para una buena turbidez de la disolución depende de los volúmenes de la muestra acuosa y del disolvente extractante.

Los factores que afectan al volumen de la fase sedimentada son los siguientes: solubilidad del disolvente extractante en agua, volumen de la muestra, volumen del disolvente dispersante y volumen de disolvente extractante. Desde el punto de vista experimental, para obtener el volumen deseado de fase sedimentada, deben hacerse antes del inicio del experimento principal algunas pruebas preliminares. En primer lugar, se calcula la solubilidad del disolvente extractante en fase acuosa y posteriormente, debido al aumento de la solubilidad del extractante en presencia del dispersante, se deben hacer varios ensayos para calcular el volumen exacto de la fase sedimentada que se obtendría al usar un volumen deseado de disolventes extractante y dispersante (Cruz-Vera, 2011).

1.6.4. Cromatografía líquida de alta y ultra resolución (HPLC y UPLC)

Los componentes típicos de un cromatógrafo de líquidos son: frascos para disolventes, bomba, inyector de la muestra, columna, detector y procesador de datos. La separación de los componentes de la muestra tiene lugar en la columna y surge como resultado de la interacción específica entre los analitos y las fases estacionaria y móvil. La gran variedad de fases estacionarias útiles en cromatografía líquida, permite un amplio rango de interacciones selectivas y aumenta las posibilidades

de separación (Skoog y West, 2008). La **Figura 1.22** muestra las fotografías de los dos cromatógrafos de líquidos utilizados en esta tesis doctoral.



Figura 1.22. Fotografías de los equipos usados (Waters®):
(a) HPLC-PDA y (b) ACQUITY UPLC-PDA

A menudo se incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y las partículas en suspensión. La forma más sencilla de llevar a cabo una separación en HPLC es mediante *elución isocrática*, es decir, manteniendo constante la composición de la fase móvil. Sin embargo, a menudo, se puede obtener un cromatograma más satisfactorio mediante *elución en gradiente*, que consiste en utilizar mezclas variables de dos o más disolventes de distinta polaridad. La relación de volúmenes de los dos disolventes (fase móvil) se modifica, de acuerdo con un programa previamente establecido, mejorando la eficacia de la separación. Según la polaridad de la fase estacionaria de la columna, se distinguen dos tipos de cromatografía: *en fase normal*, donde la fase estacionaria es muy polar y la fase móvil poco polar y *en fase reversa*, donde la fase

estacionaria es poco polar y la fase móvil presenta una mayor polaridad. Para lograr una buena separación de varios analitos, la columna debe ser capaz de reconocer las diferencias entre ellos (**Bell y Santasania, 2003**).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica muy versátil, que puede acoplarse a diferentes detectores (**Nakashima, 2005**). El detector ultravioleta más reciente es el detector de red de diodos, en el cual la radiación procedente de una lámpara de deuterio, pasa a través de un divisor de haz hacia la celda de flujo, de modo que sobre la muestra incide totalmente la radiación lumínica. El haz de luz pasa a través de otra lente que lo enfoca hacia una red de difracción produciendo la dispersión de la luz. La radiación dispersada se refleja sobre un transductor de red de diodos, consistente en una serie de 200 a 1000 fotodiodos sobre un chip de silicona. La separación que existe entre las rendijas de la red de difracción es la misma que existe entre los diodos, por ello la señal de cada diodo se va a corresponder con una radiación de diferente longitud de onda. La serie de diodos va a cubrir un amplio intervalo del espectro ultravioleta (190-800 nm). El escaneado secuencial de todas las señales da lugar a un cromatograma tridimensional (absorbancia x longitud de onda x tiempo), y permite monitorizar la muestra a más de una longitud de onda. En la práctica, esto propicia un aumento de la sensibilidad pues permite trabajar a las longitudes de onda a las cuales las respuestas cromatográficas de los analitos son máximas. Además, esta doble identificación (tiempo de retención y espectro de absorción) proporciona una mayor especificidad pues permite detectar impurezas potenciales y/o drogas coextraídas de la matriz biológica, con tiempos de retención próximos a los de las drogas en estudio, pero con espectros diferentes. Un *pico puro* se corresponde con un único compuesto, y los espectros en todos los puntos del pico deben coincidir exactamente con el espectro del compuesto (**Huber y George, 1993**).

La cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) mejora la sensibilidad, eficacia, selectividad, fácil adaptabilidad al análisis cuantitativo y la aplicación a muestras térmicamente inestables o no volátiles. Con respecto a la cromatografía de alta eficacia, logra aumentar

notablemente la resolución, la velocidad y la sensibilidad con columnas rellenas de partículas redondeadas de 1,7 μm de diámetro y presiones de 150.000 psi. Los componentes básicos de un sistema UPLC son: bandeja para los depósitos de disolventes, inyector, bomba de alta presión con mezclador a baja presión (QSM), horno de columna que permite trabajar desde 4°C a 90°C, garantizando separaciones precisas y reproducibles, detector y sistema de procesamiento de datos. Las características de UPLC incluyen:

- bajo consumo de eluyentes
- tiempos de análisis reducidos sin comprometer la cantidad y calidad de los datos analíticos.
- el sistema de lavado utiliza un solo eluyente para limpiar la parte exterior de la aguja de muestras y cebar el sistema de lavado.
- mezcla cuatro eluyentes con cualquier combinación o proporción.
- utiliza bajos volúmenes y disolventes precalentados para garantizar un comportamiento térmico consistente; los administradores de las columnas ofrecen flexibilidad de múltiples zonas con un rango de temperatura de entre 4 y 90°C.
- el sistema de disolventes binarios y el inyector pueden alcanzar presiones de hasta 150.000 psi realizando análisis más rápidos y con mayor resolución que con el HPLC tradicional (**Skoog y col, 2001**).
- la eficiencia de separación se mantiene o incluso mejora con respecto al HPLC (**Nováková y col, 2006; Wren y Tchelitcheff, 2006**).

1.7. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La preparación de la muestra tiene como finalidad la extracción de los analitos a partir de matrices complejas, en un tiempo corto y con la máxima eficacia y reproducibilidad. Los sistemas tradicionales de extracción de drogas de abuso son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). La segunda ofrece numerosas ventajas frente a la primera, ya que permite una mejor purificación de la muestra, mayor selectividad y bajos volúmenes de muestra y disolventes.

Sin embargo, el elevado consumo de drogas de abuso y antidepresivos hace necesaria una investigación continuada en este campo, desde el punto de vista analítico y toxicológico, lo que nos llevó a la búsqueda de métodos más eficaces, tales como la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es una técnica más moderna, que está cobrando una gran importancia en los últimos años. Requiere muy poco volumen de disolventes orgánicos, se alcanza rápidamente el equilibrio entre la muestra acuosa, el disolvente extractante y el disolvente dispersante, y la concentración de los analitos aumenta mucho al obtenerse un área superficial elevada entre el extractante y la muestra (se forman gotas muy finas). Los primeros trabajos solo usaban agua como matriz, pero recientemente aparecieron nuevos estudios en los que se utilizaban otras matrices, como los fluidos biológicos. Los analitos a extraer con esta técnica son muy variados, y en la revisión bibliográfica realizada se encontraron algunos trabajos en orina (**Xiong y col, 2009; Mashayekhi y col, 2010; Moradi y col, 2011**).

Después de la preparación de la muestra se procede a la determinación de las concentraciones de las drogas en las matrices correspondientes, con ayuda de diferentes técnicas analíticas: cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permite separar un gran número de sustancias sin un tratamiento químico previo. La HPLC es una técnica muy versátil y suele estar acoplada a sistemas de detección ultravioleta, fluorescencia y/o espectrometría de masas (**Nakashima, 2005**), algunos de los cuales se ven limitados dentro de la cromatografía de gases. Es ampliamente utilizada en el campo de la Toxicología para la determinación de drogas de abuso y antidepresivos en todo tipo de matrices como orina, sangre, plasma, pelo, sudor, saliva, vísceras, etc. Por todas estas razones, son numerosos los trabajos de investigación llevados a cabo con esta técnica para la determinación de opiáceos, cocaína y otras sustancias psicoactivas, junto con sus metabolitos, en plasma, saliva y otras muestras, en los que se ha variado el método de detección, el tipo

de columna, la composición de la fase móvil y el procedimiento de extracción utilizado.

La **Tabla 1.5** incluye un resumen de las publicaciones resultantes de una revisión bibliográfica sobre drogas de abuso, determinadas por HPLC, en muestras biológicas.

Tabla 1.5. Revisión bibliográfica sobre drogas de abuso

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
Opiáceos (Plasma)	SPE / MS-MS	Acetonitrilo - Tampon formiato amónico pH 4	Zorbax Bonus (150x4,6 mm, 5 µm)	Rook 2005
Morfina (Suero)	Pptación pp/ MS	Metanol - Agua + ácido fórmico	Zorbax SB-C18 (50x2,1 mm, 5 µm)	Edwards, 2005
Opiaceos, cocaína (Fluido oral)	SPE / MS	Metanol - Bicarbonato amó- nico pH 10 (30:70)	XTerra MS C18 (150x2,1 mm, 3,5 µm)	Wood, 2005
Opiáceos, cocaína (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Acetonitrilo - Formiato amónico + Ácido fórmico	Luna C18 (150x2 mm, 3 µm)	Wylie, 2005
Cocaína, BEG (Sangre, orina)	SPE / MS-MS	Formiato amóni- co - Ácido fórmico - Acetonitrilo	Synergy Polar RP (150x2 mm, 4 µm)	Duer, 2006
Opiáceos (Sangre)	SPE / MS-MS	Acetonitrilo - Tampón formiato amónico pH 3,5	Phenomenex C12 MAX-RP (150x2 mm 4 µm)	Musshoff, 2006
Opiáceos, Cocaína (Plasma)	SPE / DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6,5	XTerra RP8 (250x4,6 mm, 5 µm)	Fernández, 2006
Metadona (Sangre, orina)	SPE / DAD	Acetonitrilo - Acetato amónico 25mM (90-10)	Kromasil C18 (250x4 mm, 5 µm)	Samanidou, 2006
Opiáceos, cocaína (Saliva)	LLE / DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 6,5	XTerra RP8 (250x4,6 mm, 5 µm)	Fernández, 2007
Opiáceos (Sangre, orina)	SPE / MS-MS	Acetonitrilo - tam- pón formiato amó- nico pH 3	Sinergy Polar RP (150x2,0 mm, 4 µm)	Al-Asmari, 2007

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
Opiáceos (Sangre, orina)	SPE / MS/MS	Acetonitrilo - Tampon formiato amónico pH 3	Nova-Pack CN HP (100x3,9 mm, 4 µm)	Coles, 2007
Opiáceos (Sangre)	LLE / UV-MS	Acetonitrilo - Ácido acético - Acetato amónico	Lichrospher 100 RP-8 (250x4 mm, 5 µm)	Dordević, 2007
Metadona, EDDP, EMDP (Plasma)	Pptación pp/ MS-MS	Acetato amónico 10mM + Ác fórmico 0,001% (pH 4,5) - Acetonitrilo	Sinergy Hydro-RP 80A (50x2,0 mm, 4 µm)	Shakleya, 2007
Cocaína y metabolitos (Sangre, orina)	SPE / MS	Ácido fórmico - Agua - Acetonitrilo	Zorbax C18	Johansen, 2007
Cocaína, opiáceos, anfetam, BZD (Fluido oral)	LLE / MS-MS	Acetonitrilo - Tampón acetato (pH 5)	Atlantis dC18 (50x2,1 mm, 3 µm)	Øiestad, 2007
Cocaína (Sangre)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Agua Ácido fórmico 0,1% - Acetonitrilo	Gemini C6-Phenyl (50x3 mm, 5 µm)	Jagerdeo, 2008
Cocaína, BEG, anfetamina, opiáceos (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Metanol- acetonitrilo (80-20)+ácido fór- mico 0,1%	Allure PFP Propyl (50x2,0 mm, 5 µm)	Kala, 2008
Cocaína, opiáceos, anfetamina, BZD, ATD (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Acetonitrilo	Atlantis dC18 (50x2,1 mm, 3 µm)	Concheiro, 2008
Opiáceos (Sangre, orina)	LLE / MS-MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico -Acetato amónico	Gemini C18 (100x2 mm, 3 µm)	Gergov, 2009
Opiáceos, cocaína anfetaminas (Saliva)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Acetato amónico 2mM - Acetonitrilo 2% / Ácido fórmico 0,1% - Acetato amónico 2mM - Agua 10% en acetonitrilo	Restek AllurePFP Propil (50x2,1 mm, 5 µm)	Fritch, 2009

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
Morfina y glucurónidos (Sangre)	SPE / MS-MS	Formiato amónico - Ácido fórmico pH 2,7 / Acetonitrilo - Formiato amónico - Ácido fórmico pH 3,8	Synergy Polar (150x2 mm)	Taylor, 2009
Codeína, morfina (Plasma)	LLE / MS-MS	Metanol - Acetonitrilo - Ácido fórmico 1% (70:10:20)	Aquasil-C1 (150x2,1 mm, 5 µm)	Liao, 2009
29 drogas abuso (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Acetato amónico 2mM pH 6,2 - Metanol	Acquity UPLC HSS T3 C18 (100x2,1mm, 1,8 µm)	Badawi, 2009
Drogas de abuso (Sangre)	SPE / MS-MS	Metanol - Formiato amónico	Varian Pursuit 3 C18 (100x3 mm, 3 µm)	Björk, 2010
Opiáceos, cocaína, anfetamina (Saliva)	Pptación pp/ MS-MS	Acetonitrilo - Acetato amónico 10mM pH 6,25	Waters HSS T3 (100x2,1 mm, 1,8 µm)	Wang, 2010
Buprenorfina, metadona, cocaína, opiáceos (Fluido oral)	Pptación pp / MS-MS	0,1% Ácido fórmico en agua - 0,1% Ácido fórmico en acetonitrilo	Synergy Polar-RP 80A (75x2 mm, 4 µm)	Concheiro, 2010
Anfetaminas, cocaína (Fluido oral)	SPME / MS-MS	Acetonitrilo - Ácido fórmico 5mM en acetonitrilo	C18 Gemini (100x2,1 mm, 3 µm)	Sergi, 2010
Drogas de abuso (Suero)	Pptación pp/ MS-MS	Ácido fórmico 0,1% y formiato amónico 1mM / Acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico y formiato amónico 1mM	Restek Allure PFP Propyl (50x2,1 mm, 5 µm)	Bassan, 2011
opiáceos, cocaína, anfetaminas (Sangre)	SPE / MS-MS	Agua+metanol+ acetato amónico 25mM / Metanol+ 2propanol+HCOOH	Phenomenex Hypurity C8 (100x4,6 mm, 5 µm)	Dowling, 2011

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
Drogas ilegales (Saliva)	SPE / MS-MS	Acetato amónico 10mM+ácido fórmico 0,1%+agua / Acetonitrilo+ácido fórmico	Restek Pinnacle DB C18 (100x2,1 mm, 3 µm)	Heltsley, 2011
Drogas ilegales (Fluido oral)	LLE / MS-MS	Tampón formiato amónico 10mM pH 3,1 - Metanol	HSS T3 C18 (100x2,1 mm, 1,8 µm)	Lund, 2011
Opiáceos, cocaína (Saliva)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Acetato amónico 2mM - Acetonitrilo	Restek Allure PFP-Propyl (50x2,1 mm, 5 µm)	Cone, 2012
Metadona (Orina, plasma Saliva)	DLLME / UV	0,1% Ácido fluorocético en metanol - Agua (60:40)	Columna C18 (250x4,6 mm, 10 µm)	Ranjbari, 2012
Drogas abuso (Plasma, orina)	µSPE / MS-MS	10% Acetonitrilo en metanol - Ácido fórmico 5mM en agua	Kinetex C18 (150x2,1 mm, 2,6 µm)	Napoletano 2012
Drogas de abuso (Sangre)	SPE / TOF-MS	Ácido fórmico 0,1% - acetonitrilo	UPLC BEH C18 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Birkler, 2012
67 drogas (Sangre)	Pptación pp/ TOF-MS	Formiato amónico 5mM, pH 3,5 - Metanol	Zorbax RRHT Eclipse Plus C18 (100x3,0 mm, 1,8 µm)	Marín, 2012
Anfetaminas, BZD, cocaína, opiáceos (Sangre)	SPE / MS-MS	0,1% amoníaco acuoso (25%) en agua - 0,1% amoníaco acuoso (25%) en metanol	AcquityUPLC C18 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Björk, 2013
Opiáceos, cocaína (Sangre, orina)	SPE / MS-MS	Acetona - Ácido heptafluoro-butírico al 0,05% (5:95)	Spherisorb C18 S5W (200x2 mm, 5 µm)	Oberacher, 2013
Opiáceos, cocaína (Sangre)	SPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% en agua - Ácido fórmico 0,1% en metanol	Acquity UPLC BEH Phenyl (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Ramírez -Fernández, 2013
Metadona y otras drogas (Sangre)	Pptación pp/ MS-MS	Agua+ácido fórmico 5mM - Acetonitrilo	Zorbax XDB-C18 (100x2,1 mm, 1,8 µm)	Vincenti, 2013

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
44 drogas (Fluido oral)	Pptación pp/ MS-MS	Agua+ácido fórmico 5mM / Acetonitrilo+ác, fórmico 5mM	Columna C18 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Di Corcia, 2013
Cocaína y metabolitos (Plasma)	LLE / MS-MS	Trifluoroacetato amónico 0,5g/L en acetonitrilo / Trifluoroacetato amónico 0,5g/L en acetonitrilo: metanol: agua (700:175:125)	Ascentis®Express HILIC (50x3,0 mm, 2,7 µm)	Liu, 2014
Heroína, Metadona (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Bicarbonato amónico pH 8,5 - Metanol	AcquityUPLC BEH C18 (50x2,1 mm, 1,7 µm)	Vindenes, 2014
Drogas de abuso (Sangre)	SPE / TOF-MS	Formiato amónico 2mM+ ácido fórmico 0,05% en agua / Formiato amónico 2mM + ácido fórmico 0,05% en acetonitrilo	Waters Xterra MS C18 (150x2,1 mm, 3,5 µm)	Teng, 2015
Opiáceos, cocaína (Plasma)	DLLME / PDA	Acetonitrilo - Tampón fosfato 50mM pH6,5 - Agua	XBridge RP18 (250x4,6 mm, 5 µm)	Fernández, 2015
Opiáceos, cocaína anfetaminas (Sangre)	SPE / MS-MS	Formiato amónico 5 mM + Ácido fórmico 0,1% en agua / Acetonitrilo	Pinnacle DB PFPP (50x2,1 mm, 1,9 µm)	Dulaurent, 2016
Metadona (Plasma)	µSPE / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% en ACN+agua (5:95) / Ácido fórmico 0,1% en metanol	Zorbax Bonus-RP (100x2,1 mm, 3,5 µm)z	El-Beqqali, 2016
Cocaína y metabolitos (Plasma)	MIP-µSPE / MS-MS	Diclorometano/ Isopropanol/ Hidróxido amónico (76:20:4)	Kinetex C18 (100x2,1 mm, 5,0 µm)	Sánchez- Glez, 2016

Analitos/Matriz	Extracción/ Detector	Fase móvil	Columna	Autor, Año
23 drogas psicoactivas (Sangre seca)	Dilución en metanol / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% en ACN / Formiato amónico 5mM pH 3	Acquity UPLC HSS C18 (150x2,1 mm, 1,8 µm)	Kyriakou, 2016
11 drogas (Dientes y otras muestras biológicas)	US / MS-MS	Ácido fórmico 2% en agua + Formiato amónico 2mM / Ácido fórmico 0,1% en metanol	Luna PFP (150x2 mm, 5 µm)	Klima, 2016
3 catinonas y 7 drogas clásicas (Plasma)	MEPS / PDA	Ácido fórmico 0,1% en agua / Ácido fórmico 0,1% en ACN,	BEH Shield RP18 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Fernández, 2017
21 drogas clásicas (Fluido oral)	LLE / MS-MS	Formiato amónico 5mM pH 10,2 - Metanol (B)	Acquity UPLC BEH C18 (50x2,1 mm, 1,7 µm)	Valen, 2017
11 drogas ilegales (Sangre seca)	Dilución en metanol-ACN (3:1) / MS-MS	ACN- Formiato amónico 2mM (95:5) / Formiato amónico 2mM-ACN (95:5)	Waters Acquity UPLC®HSS T3 (100x2,1 mm, 1,8 µm)	Sadler Simões, 2018
7 opiáceos (Fluido oral)	SPE / MS-MS	Formiato amónico 5mM + ácido fórmico 0,1% / Metanol + ácido fórmico 0,1%	Poroshell 120 SB-C18 (100x2,1 mm, 2,7 µm)	Grabenaue 2018

Como ya se ha comentado, la preparación de la muestra es la etapa más importante de un proceso analítico pues tiene un efecto directo sobre la calidad de los resultados. Hay muchos trabajos que reportan datos obtenidos después de la aplicación de procedimientos convencionales para la determinación de antidepresivos en diferentes fluidos biológicos (**Vlase y col, 2005; Saracino y col, 2006; Bahrami y col, 2009**). La extracción líquido-líquido es una de las técnicas más antiguas de preconcentración y aislamiento de los analitos, y requiere mucho tiempo y grandes cantidades de disolvente orgánico. Para solucionar estos problemas, las investigaciones más recientes se orientaron hacia el desarrollo de nuevas técnicas eficaces, económicas

y miniaturizadas, entre las que se encuentra la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), ya explicada en el apartado 1.6.4. Desde que **Rezaee y col (2006)** publicaron el primer trabajo relacionado con esta técnica surgieron numerosos estudios usando matrices acuosas (**Fan y col, 2008; Melwanki y Fuh, 2008; Saraji y col, 2011**), o matrices biológicas (**Ito y col, 2011; Xu y col, 2009; Lili y col, 2010**).

También fueron publicados varios métodos de cromatografía de gases para el análisis de antidepresivos, pero todos requirieron una etapa de derivatización para aumentar la volatilidad de estos compuestos. Esta etapa no es necesaria en la cromatografía líquida, por lo que se está convirtiendo en la técnica de elección para el análisis de estas drogas pues requiere menos tiempo y posibilita la obtención de buenos parámetros de validación. Existen varios detectores, como el ultravioleta-UV, array de diodos-DAD (**Wozniakiewicz y col, 2008; Rodrigues Chaves y col, 2009; Ghambarian y col, 2012**) o el espectrómetro de masas-MS (**Juan y col, 2005; Kirchherr y col, 2006**), el cual proporciona una buena selectividad y especificidad. Sin embargo, se debe destacar que la técnica HPLC-DAD ofrece ventajas, tales como un bajo coste, fácil mantenimiento y adecuada selectividad, todas ellas propiedades muy convenientes para realizar análisis de screening general.

La **Tabla 1.6** incluye una revisión bibliográfica sobre antidepresivos, en especial los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), determinados por cromatografía de líquidos en diversas matrices biológicas.

Tabla 1.6. Revisión bibliográfica sobre antidepresivos

Analitos / Matriz	Extracción / Detector	Fase Móvil	Columna	Autor, Año
Fluoxetina, Norfluoxetina (Plasma)	LLE / FLD	Acetonitrilo - Tampón fosfato (31:69)	ZorbaxSB-C18 (150x3,0 mm, 3,5 µm)	Vlase, 2005
Fluoxetina, Paroxetina Venlafaxina (Plasma)	SPE / MS	Ác, fórmico 0,6% - Acetato amónico - Acetonitrilo (35:65)	Acherey-Nagel C18 (250x4,6 mm, 5 µm)	Juan, 2005
Mirtazapina (Plasma)	HF-LPME / UV	Hexano-Etanol (98:2) - Dietilamina 0,1%	Chiralpak AD (250x4,6 mm, 10 µm)	Malagueño de Santana, 2005

48 antidepresivos y antipsicóticos (Plasma)	Pptación pp / MS-MS	Metanol - Tampón acetato pH 3	Chromolith Speed ROD C18 (50x4,6 mm, 5 µm)	Kirchherr, 2006
Compuestos orgánicos (Agua)	DLLME / GC-FID		BP-5 (30mx0,22mm, 0,25 µm)	Rezaee, 2006
Fluvoxamina (Plasma)	SPE / UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 3,5+ trietil-amina	Varian ReSelut C8 (150x4,6 mm, 5 µm)	Saracino, 2006
Citalopram, Norcitalopram (Plasma)	DAD	Acetonitrilo 8% en agua desionizada - Tampón fosfato pH 6,4 - ACN (50/50)	LiChrospher CN- (250x4,6 mm, 5 µm)	Greiner, 2007
Fluoxetina, sertralina, mirtazapina (Plasma)	SBSE / UV	Tampón acetato pH 4,5 - Acetonitrilo - Metanol (60:37:3)	Lichrocart RP18 (125x4 mm, 5 µm)	Rodrigues Chaves, 2007
Fluoxetina, sertralina, citalopram, mirtazapina (Plasma)	LLE / UV	Acetonitrilo - Metanol (92/8) - Tampón acetato pH 4,5 (35:65)	LiChrospher 60 RP-selectB (250x4 mm, 5 µm)	Malfará, 2007
Fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina (Sangre)	LLE / MS	Acetonitrilo - Tampón formiato amónico pH 3,2	XTerra RP18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Castaing, 2007
Amitriptilina, imipramina, sertralina (Plasma, orina)	HF-LPME / UV	Ácido acético pH 4 - Metanol (54:46)	Zorbax Extend C18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Esrafil, 2007
Fluoxetina (Plasma)	SBSE / GC-MS		HP5 MS (30 mx0,25 mm, 0,25 µm)	Fernandes, 2008
Sertralina (Suero)	UV	Tampón fosfato pH 3,5 - Acetonitrilo (71:29)	Vydac C18	Espinosa, 2008
9 antidepresivos (Plasma, saliva)	SPE / MS-MS	Tampón formiato pH 3 - Acetonitrilo	Sunfire C18 (20x2,1 mm, 3,5 µm)	De Castro, 2008

Antidepresivos tricíclicos (Plasma)	MAE / DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato (1:1)	Perkin Elmer SC18 (100x4,6 mm, 5 µm)	Wozniakiewicz, 2008
Citalopram, Fluoxetina (Orina)	SPME / DAD	Cloruro tetra-metilamonio - Acetonitrilo (50/50)	Spherisorb ODS 2 (150x4,0 mm, 5 µm)	Unceta, 2008
Venlafaxina (Plasma)	CPE / FLD	Tampón fosfato pH 3,0 - Acetonitrilo - Trietilamina (33,5:66,5:0,4)	Diamonsil C18 (250x4,6 mm, 5 µm)	Qin, 2008
Mirtazapina, Citalopram, Paroxetina, Sertralina, Fluoxetina (Plasma)	SPME / UV	Tampón fosfato pH 3,8 - Acetonitrilo (53:47)	LiChrospher 60 RP18 (250x4,0 mm, 5 µm)	Gonzalves Silva, 2008
Drogas ilegales (Fluido oral)	LLE / GC-MS		DB-5MS 5% phenylmethylsiloxane (30 mx0,32-mm, 0,25 µm)	Langel, 2008
Sertralina (Suero)	LLE / FLD	Metanol - Tampón fosfato pH 3,7 (63:37)	LiChrosorb CN (250x4,0 mm, 5 µm)	Bahrami, 2009
Sertralina, N-desmetilsertralina (Plasma)	LLE / MS-MS	750mL Metanol - 250mL Agua - 2,5 mL Trifluoroacetato amónico 1M	Betasil C8 (100x2,1 mm, 5 µm)	Patel, 2009
Fluoxetina (Plasma)	SPE / MS	Acetonitrilo - Formiato amónico 0,05M (25:75)	Kromasil C18	Saber, 2009
Mirtazapina, Citalopram, Paroxetina, Duloxetina (Plasma)	SPME / DAD	Tampón fosfato pH 3,8 - Acetonitrilo (57:43)	Lichrospher RP: Select B (250x4,0 mm, 5 µm)	Rodrigues Chaves, 2009

Amitriptilina Clomipramina (Orina)	DLLME / UV	Tampón ace- tato pH 5,5 - Acetonitrilo (60:40)	Simmetry C8 (150x3,9 mm, 5 µm)	Xiong, 2009
29 drogas abuso (Saliva)	SPE / MS-MS	Acetato amónico 2mM pH 6,2 - Metanol 100%	Acquity UPLC HSS T3C18 (100x2,1 mm, 1,8 µm)	Badawi, 2009
Sertralina, Mirtazapina, Fluoxetina, Paroxetina (Plasma)	MEPS / UV	Tampón fosfato pH 4,5 - Metanol (55:45)	Lichrocart RP18 (125x4 mm, 5 µm)	Rodrigues Chaves, 2010
Venlafaxina (Plasma)	LLE / FLD	Metanol - Agua (35:65) pH 2,5 con PO ₄ H ₃	Chromolith RP18 (100x4,6 mm, 5 µm)	Ardakani, 2010
Fluoxetina, Citalopram, Venlafaxina (Plasma, orina)	SBSE / FLD	Cloruro tetra- metilamonio - Acetonitrilo (40/60)	Extrasil ODS (250x4,0 mm, 5 µm)	Unceta, 2010
Citalopram, Doxepina, Fluoxetina, Sertralina (Plasma, orina)	SPME / MS	Acetonitrilo - Tampón acetato pH 4,5 (40:60)	Kromasil ODS (150x4,6 mm, 5 µm),	Zheng, 2010
Antidepresivos tricíclicos (Orina)	DLLME/ GC-MS		DB-5MS fused sílica (30mx0,25 mm, 0,5 µm)	Ito, 2011
Mirtazapina (Plasma)	LLE / MS-MS	Acetato amóni- co - Acetonitrilo - Acido fórmico (60:40:0,1)	Eclipse XDB C18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Chorilli, 2011
Bupropión, Moclobemida, Reboxetina, Trazodona (Plasma)	SPE / MS	Tampón acetato pH 9 - Acetonitrilo	XBridge C18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Choong, 2011
Mirtazapina, Citalopram (Plasma, orina)	MEPS / UV	Tampón acetato pH 4,2 - Metanol (30:70)	Dionex Acclaim 120 C18 (250x4,6 mm, 5 µm)	Rani, 2011

Antidepresivos, Antipsicóticos (Suero)	SPE / MS-MS	0,1% Ácido fórmico en agua - 0,1% ácido fórmico en metanol,	Zorbax SB-C8 50x2,0 mm, 1,8 µm)	Hasselstrøm, 2011
34 antidepresivos (Plasma)	LLE / MS-MS	Tampón formiato pH 3,4 - Acetonitrilo +0,1% ácido fórmico	Hypersil Gold Phen (100x2,1 mm, 1,9 µm)	Remane, 2011
Amitriptilina, Imipramina (Suero)	MEPS / DAD	Tampón fosfato pH 2,36-Acetonitrilo (40:60)	Spheri-5 C18 (100x4,6 mm, 5 µm)	Wietecha- Posluszni, 2012
Antidepresivos tricíclicos (Plasma, orina)	HF-LLME / DAD	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 4 (40:60)	Zorbax Eclipse XDB C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Ghambarian, 2012
Sertralina (Plasma)	Pptación pp / FLD	Acetonitrilo - Agua (80:20)	Waters NovaPack C18 (150x3,9 mm, 4 µm)	Melis, 2012
Citalopram, Fluoxetina, Sertralina (Plasma)	SPE / MS	Tampón acetato pH 8,1 +hidróxido amónico 25% - Acetonitrilo	XBridge C18 (100x2,1 mm, 3,5 µm)	Ansermot, 2012
Sertralina, Fluoxetina, Citalo-pram, Paroxetina, Venlafaxina (Suero)	Pptación pp / MS-MS	Acetato amónico + ácido fórmico + 5% acetonitrilo - Acetato amónico + ácido fórmico + 95% acetonitrilo	Acquity UPLC RP BE C18 (50x2,1 mm, 1,7 µm)	Urinovska, 2012
Duloxetina (Plasma)	DLLME-SFO / FLD	Tampón formiato amónico pH 3,8 - Etanol (57:43)	Luna C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Suh, 2013
Venlafaxina, Desmetilvenlafaxina (Plasma)	SPE / MS-MS	Tampón acetato amónico pH 5,75 / acetonitrilo (97:3) - Tampón acetato amónico pH 5,75 / acetonitrilo (95:5)	Chiral AGP (100x4 mm, 5 µm)	Dutta, 2013
10 drogas psicotrópicas (Plasma)	Pptación pp / MS-MS	Tampón formiato pH 3,0 - Acetonitrilo	Acquity UPLC BEH Shield RP18 (50x2,1 mm, 1,7 µm)	Ansermot, 2013

15 antidepresivos y otros fármacos (Sangre)	LLE / MS-MS	Formiato amónico 5mM, pH 10,2 - Acetonitrilo	Acquity UPLC BEH C18 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Amundsen, 2013
6 antidepresivos tricíclicos (Saliva)	MEPS / UHPLC-MS	Acetonitrilo - Ácido fosfó- rico pH 2,36 + 1% Dietilamina (35:65)	Dionex Acclaim 120 C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Wozniakiewicz, 2014
Citalopram, Paroxetina, Fluoxetina (Plasma, orina)	Inyec direc- ta/ FLD	SDS 0,075M - 6% Butanol pH 7 + NaH ₂ PO ₄ 0,01M	Kromasil C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Agrawal, 2014
Imipramina, Trimipramina (Orina)	DLLME / UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato amónico	Eclipse XDB-C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	Shamsipur, 2014
88 drogas psicotrópicas (Sangre)	Pptación pp / MS-MS	Ácido fórmico 0,1% - Metanol	Hypersil Gold aQ (100x2,1 mm, 3 µm)	Sempio, 2014
33 antidepresivos (Sangre)	LLE / MS-MS	Formiato amó- nico 10mM+á- cido fórmico 0,1%, pH 3,4 - Acetonitrilo+ácido fórmico 0,1%	Waters SunFire C18 (150x2,1 mm, 3,5 µm)	Montenarh, 2014
Fluoxetina, Clomipramina (Orina)	MEPS / PDA	Agua con áci- do fórmico 0,1%-Acetonitrilo	Columna Acquity UPLC-Silica HSS T3 (100x2,1 mm, 1,7 µm)	Alves, 2015
Mirtazapina, citalopram, sertralina, fluoxetina (Plasma)	MEPS / MS-MS	Acetato amóni- co 5mM+ácido fórmico 0,1% - Acetonitrilo	Columna XSelect CSH C18 (100x2,1 mm, 2,5 µm)	De Souza, 2015
Citalopram, sertralina (Plasma, orina)	Dispersive µ-SPE / UV	Tampón fosfato monopotásico pH 3,8 - Acetonitrilo (40:60)	Columna ODS-H C18 (250x4,6 mm, 5 µm)	Asgharinezhad, 2015

Fluoxetina (Plasma, orina)	DLLME / UV	Acetonitrilo - Tampón fos- fato+cloruro de tetraetilamonio al 0,15%, pH 3 (35:65)	Columna C18 (150×4,6 mm, 4 µm)	Hamed, 2016
Citalopram, Fluvoxamina, Doxepina (Plasma)	DLLME / UV	Tampón fosfato pH3 - Acetonitrilo (55:45)	Columna ODSIII (250×4,6 mm, 5 µm)	Asghari, 2016
Citalopram, Sertralina, Diacepam (Suero, orina)	UA-DLLME- SFODs / UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato pH 5,5 (1:1)	Columna C18 (150×4,5 mm, 5 µm)	Farsimadan, 2016
Clomipramina (Plasma)	UADM-SPE / UV	Acetonitrilo - Tampón fosfato 20mM, pH 4,7 (80:20) con 0,05% de ácido trifluoroacético	Columna C18 (250×4,6 mm, 5 µm)	Hamidi, 2017
Mirtazapina, Citalopram, Sertralina, Fluoxetina (Plasma)	Disposable pipette extraction (DPX)/ MS-MS	Acetato amónico 5mM - 0,1% de ácido fórmico - Acetonitrilo	XSelect CSH C18 (100×2,1 mm, 2,5 µm)	Lemos Pinto, 2017
Citalopram, Sertralina, Fluvoxamina, Fluoxetina (Plasma)	SPE / UV	Metanol - Agua- Acetonitrilo - Tampón fosfato 50mM, pH 5 (25:20:25:30)	Columna Inert sill ODS (250×4,6 mm)	Lotfi, 2017
Bupropion, Citalopram, Amitriptilina, Trazodona (Plasma, orina)	Bar ad- sorptive Microextrac- tion (BAµE) / MS-MS	Agua con 2,5% de ácido acético - Acetonitrilo	Kinetex C18 (150×4,6mm, 2,6 µm)	Ide, 2018
Venlafaxina, Amitriptilina (Plasma)	UA-IL-DLLME / DAD	Acetonitrilo- Metanol-Agua (70:25:5)	Columna µBondapak C18 (150×3,9mm, 10 µm)	Vaghar- Lahijani, 2018

1.8. REFERENCIAS

Agrawal N, Esteve-Romero J, Bose D, Dubey NP, Vicente JP, Carda-Broch S. *Determination of selective serotonin reuptake inhibitors in plasma and urine by micellar liquid chromatography coupled to fluorescence detection*. J Chromatogr B, 965: 142-149 (2014).

Al-Asmari AI, Anderson RA. *Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 31: 394-408 (2007).

Alves V, Gonçalves J, Conceição C, Teixeira HM, Câmara JS. *An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent with ultra high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine*. J Chromatogr 1408: 30-40 (2015).

Amundsen I, Øiestad ÅML, Ekeberg D, Kristoffersen L. *Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 927: 112-123 (2013).

Ansermot J, Brawand-Amey M, Eap CB. *Simultaneous quantification of selective serotonin reuptake inhibitors and metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. J Chromatogr B, 885-886: 117-130 (2012).

Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB. *Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. J Chromatogr A, 1292: 160-172 (2013).

Aps JKM, Martens LC. Review: *The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva*. Forensic Science International 150: 119-31 (2005).

Ardakani YH, Foroumadi A, Rouini MR. *Development and validation of a rapid HPLC-fluorescence method for simultaneous determination of venlafaxine and its major metabolites in human plasma*. DARU (Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences), 18: 97-102 (2010).

Arthur CL, Pawliszyn J. *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal Chem, 68: 2145-2148 (1990).

Asghari A, Bazregar M, Rajabi M, Fahimi E. *Application of tandem dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of doxepin, citalopram, and fluvoxamine in complicated samples*. J Sep Sci, 39: 4828-4834 (2016).

Asgharinezhad AA, Karami S, Ebrahimzadeh H, Shekari N, Jalilian N. *Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids*. Intern J Pharm 494: 102-112 (2015).

Badawi N, Wiese Simonsen K, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. *Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS*. Clin Chem, 55: 2004-2018 (2009).

Bahrami G, Mohammadi B, Farshchi A, Ghiasi G. *Quantitative analysis of sertraline in human serum by LC with fluorescence detection after pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofluorazan*. Chromatographia, 70: 323-327 (2009).

Baliková M, Vercerková J. *HPLC confirmation of cocaine and BEG in biological samples using PDA after toxicological screening*. J Chromatogr B, 656: 267-273 (1994).

Bassan DM, Erdmann F, Krüll R. *Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 400: 43-50 (2011).

Bell D, Santasania C. Supelco, Bellefonte, P.A. (2003).

Benowitz NL. *Clinical pharmacology and toxicology of cocaine*. Pharmacol Toxicol, 72: 3-12 (1993).

Bernal JL, Del Nozal, MJ, Rosas V, Villarino A. *Extraction of basic drugs from whole blood and determination by HPLC*. Chromatographia, 38: 617-623 (1994).

Berridge JC. *Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations* Ed. John Willey and Sons. London. 1985.

Birkler RID, Telving R, Ingemann-Hansen O, Charles AV, Johannsen M, Andreasen MF. *Screening analysis for medicinal drugs*

and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)—Toxicological findings in cases of alleged sexual assault. Forensic Sci Int, 222: 154-161 (2012).

Bjork MK, Nielsen MK, Markussen LO, Klinker HB, Linnet K, Boyer CS, Petersen DR. *Pharmacokinetic analysis of the metabolism of cocaine to norcocaine and N-hydroxynorcocaine in mice. Drug Metabol Dispos, 20: 863 (1992).*

Bjork MK, Nielsen MK, Markussen LØ, Klinker HB, Linnet K. *Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 396: 2393-2401 (2010).*

Bjork MK, Simonsen KW, Andersen DW, Dalsgaard PW, Sigurðardóttir SR, Linnet K, Rasmussen BR. *Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 405: 2607-2617 (2013).*

Boyer CS, Petersen DS. *Pharmacokinetic analysis of the metabolism of cocaine to norcocaine and N-hydroxynorcocaine in mice. Drug Metabol Dispos, 20: 863-868 (1992).*

Brachet A, Christen P, Veuthey. *Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. Phytochem Anal, 13: 162-169 (2002).*

Braithwaite RA, Jarvie DR, Minty PSB, Simpson D, Widdop B. *Screening for drugs of abuse. I: Opiates, amphetamines and cocaine. Ann Clin Biochem, 32: 123-153 (1995).*

Brunton L (Editor). *Goodman&Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México. McGraw Hill, 12ª ed, 2012.*

Buján L, Fernández P, Lafuente N, Aldonza M, Bermejo AM. *Comparison of two chromatographic methods for the determination of cocaine and its metabolites in blood and urine. Anal Letters, 34:2263-2275 (2001).*

Caddick S. *Microwave-assisted organic reactions. Tetrahedron, 51: 10403-10432 (1995).*

Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. *Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by HPLC with electrospray tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 23: 620-624 (1999).

Camel V. *Extraction techniques*. Anal Bioanal Chem, 372: 39-40 (2002).

Camel V. *Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples*. Trends in Anal Chem, 19: 229-248 (2000).

Cami J. *Urgencias por drogas de abuso*. Rev Toxicol, 7: 131-134 (1990).

Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. *Use of gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization for the determination of opiates in human oral fluid*. Rapid Commun Mass Spectrom, 20: 1288-1292 (2006).

Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. *Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography-positive chemical ionization-mass spectrometry (GC/PCI-MS)*. J Anal Toxicol, 27: 270-274 (2003).

Caplehorn JR, Drummer OH. *Mortality and NSW methadone programs: lives lost and saved*. Med J Australia 170: 104-109 (1999).

Castaign N, Titier K, Receveur-Daurel M, Le-Déodic M, Le-bars D, Moore N, Molimard M. *Quantification of eight new antidepressants and five of their active metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 31: 334-341 (2007).

Cela, R, Lorenzo, RA, Casais, MC. *Técnicas de separación en Química Analítica*. Ed. Síntesis. Madrid. 2002. Pág. 228-240.

Chen X-H, Wijsbeek J, Franke J-P, Zeeuw RA. *A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine*. J. Forensic Sci, 37: 61-71 (1992).

Choong E, Rudaz S, Kottelat A, Haldemann S, Guillarme D. *Quantification of 4 antidepressants and a metabolite by LC-MS for therapeutic drug monitoring*. J Chromatogr B, 879: 1554-1550 (2011).

Chorilli M, Bon ilio R, Louvandini CR, Madia Gonçalves FAR, Nunes Salgado HR. *Development and validation of an LC-MS/MS*

method for quantitative analysis of mirtazapine in human plasma.

Am J Anal Chem, 2: 650-657 (2011).

Clark JC, Milroy CM, Forrest ARW. *Deaths from methadone use.* J Clin Forens Med, 2: 143-144 (1995).

Coles R, Kushnir MM, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. *Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS.* J Anal Toxicol, 31: 1-14 (2007).

Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem, 391: 2329-2338 (2008).

Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. *High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem, 398: 915-924 (2010).

Cone EJ, Kumor K, Thompson LK, Sherer M. *Correlation of saliva cocaine levels with plasma and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects.* J Anal Toxicol, 12: 200-206 (1988).

Cone EJ, Menchen SL. *Stability of cocaine in saliva.* Clin Chem, 34: 1508 (1988).

Cone EJ, Oyler J, Darwin DW. *Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal and smoked administration.* J. Anal. Toxicol. 21: 465-475 (1997).

Cone EJ. *Oral fluid results compared to self reports of recent cocaine and heroin use by methadone maintenance patients.* Forensic Sci Int, 215: 88-91 (2012).

Cone EJ. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine.* J Anal Toxicol, 19(6): 459-478 (1995).

Cone EJ. *Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine and*

beard compared to drug-induced effects on pupils and behaviour. J Anal Toxicol, 14: 1-7 (1990).

Croteau LG, Akhtar, M.H.; Bélanger, J.M.R.; Paré, J.R.J. *High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle.* J Liq Chrom, 17: 2971-2981 (1994).

Crump KL, McIntyre IM, Drummer OH. *Simultaneous determination of morphine and codeine in blood and bile using dual ultraviolet and fluorescence HPLC.* J Anal Toxicol, 18: 208-212 (1994).

Cruz-Vera M. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* In: Meyers RA, *Encyclopedia of Analytical Chemistry, Applications, Theory and Instrumentation*. 1st edit, Wiley, USA, 2011.

De Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices.* J Pharm Biomed Anal, 48: 183-193 (2008).

De Oliveira CDR, Roehsig M, De Almeida RM, Rocha WL, Yonamine M. *Recent advances in chromatographic methods to detect drugs of abuse in alternative biological matrices.* Current Pharm Anal, 3: 95-109 (2007).

De Souza ID, Domingues DS, Queiroz MEC. *Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.* Talanta, 140: 166-175 (2015).

Dean JR, Fitzpatrick, L.; Heslop, C. *Microwave-assisted solvent extraction in organic analysis* En Handley, A.J. (Ed.) *Extraction methods in organic analysis*. Ed. CRC Press. Sheffield. 1999.

Del Río J, Flórez J. *Fármacos antidepresivos y antimaníacos* En Flórez J “*Farmacología humana*”, Masson 4^a edic, Barcelona, 2005.

Di Corcia D, Lisi S, Pirro V, Gerace E, Salomone A, Vincenti M. *Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B, 927: 133-141 (2013).

Djozan D, Assadi Y, Haddadi SH. *Anodized aluminum wire as a solid-phase microextraction fiber*. Anal Chem, 73: 4054-4058 (2001).

Dordevic S, Kilibarda V. *Analytical confirmation of lethal heroin overdose by the use of liquid chromatography methods*. Vojnosanit Pregl, 64: 739-743 (2007).

Dowling G, Regan L. *A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids. Cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection*. J Pharm Biomed Anal 54: 1136-1145 (2011).

Drummer OH, Opeskin K, Syrjanen M, Corder SM. *Methadone toxicity causing death in ten subjects starting on a methadone maintenance program*. Am J Forens Med Pathol, 13(4): 346-350 (1992).

Drummer OH, Syrjanen M, Opeskin K, Corder S. *Deaths of heroin addicts starting on a methadone maintenance programme*. Lancet, 335: 108 (1990).

Drummer OH. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. Arnold. London, 2001.

Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. *Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolyses in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine*. J Forensic Sci, 51: 421-425 (2006).

Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier J-M, Marquet P, Saint-Marcoux F. *QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood*. Anal Bioanal Chem, 408: 1467-1474 (2016).

Dutta L, Ahmad SI, Mukherjee SK, Mishra S, Khuroo A, Tausif M. *Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous stereoselective determination of venlafaxine and its major metabolite, O-desmethylenlafaxine, in human plasma*. Biomed Chromatogr, 27: 622-635 (2013).

EDADES 2017: *Encuesta sobre Alcohol y otras Drogas en España, 1995-2017*. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Centro de Publicaciones, 2017.

Edwards, SR. Smith, MT. *Determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide and noroxycodone concentrations in rat serum by liquid chromatography (LC)-electrospray mass spectrometry (EMS)*. In: Warwick P. Anderson, 8th World Conference on Clinical Pharmacology & Therapeutics 2004 - Abstracts. CPT2004, Brisbane, (152-152). 1-6 August 2004.

Edwards SR, Smith MT. *Simultaneous determination of morphine, oxycodone, morphine-3-glucuronide, and noroxycodone concentrations in rat serum by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 814: 241-249 (2005).

El-Beqqali A, Abdel-Rehim M. *Molecularly imprinted polymer-sol-gel tablet toward micro-solid phase extraction: I. Determination of methadone in human plasma utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 936: 116-122 (2016).

Elorza Ricart J, Fina Avilés F, Hermosilla Pérez E, Uriona Tuma S, Prieto Alhambra D, Medina Peralta M. *La crisis económica aumenta el número de personas en tratamiento antidepresivo*. 32º Congreso de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. Bilbao, 2012.

Eskilsson CS, Björklund, E. *Analytical-scale microwave-assisted extraction*. J Chromatogr A, 902: 227-250 (2000).

Espinosa Bosch M, Ruiz Sánchez AJ, Sánchez Rojas F, Bosch Ojeda C. *Analytical methodologies for the determination of sertraline*. J Pharm Biomed Anal, 48: 1290-1302 (2008).

Esrafilí A, Yamini Y, Shariati S. *Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids*. Anal Chim Acta, 604: 127-133 (2007).

Fan YC, Hu ZL, Chen ML, Tu CS, Zhu Y. *Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples*. Chinese Chemical Letters, 19, 985-987 (2009).

Fangmamn P, Assian H. *“Antidepresivos (II): La imipramina y el origen de los fármacos antidepresivos: de los antihistamínicos a*

los antidepresivos heterocíclicos En López-Muñoz F. Historia de la Psicofarmacología. Edit Médica Panamericana. Madrid, 2007.

Farsimadan S, Goudarzi N, Chamjangali MA, Bagherian G. *Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high performance liquid chromatography*. Microchem J, 128: 47-54 (2016).

Fernandes C, Van Hoeck E, Sandra P, Lanças FM. *Determination of fluoxetine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry using stir bar sorptive extraction*. Anal Chim Acta, 614: 201-207 (2008).

Fernández P, González M, Regenjo M, Ares AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. *Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A 1485: 8-19 (2017).

Fernandez P, Lafuente N, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M, Cruz A. *HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers*. J Anal Toxicol, 20: 224-228 (1996).

Fernández P, Morales L, Vázquez C, Bermejo AM. *HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma*. Forensic Sci Int, 161: 31-35 (2006).

Fernández P, Morales L, Vázquez C, Lago M, Bermejo AM. *Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography*. J Appl Toxicol, 28: 998-1003 (2008).

Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. *Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography*. J Applied Toxicol, 35: 418-425 (2015).

Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

Franke M, Winek CL, Kingston HM. *Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation*. Forensic Sci Int, 81: 51-59 (1996).

Fritch D, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, Cone EJ. *Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 33: 569-577 (2009).

Gaillard Y, Pepin G. *Use of HPLC with PDA detector for the creation of a 600-compound library. Application to forensic toxicology*. J Chromatogr A, 763: 149-163 (1997).

Ganzler K, Salgó A, Valkó K. *Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography*. J Chromatogr, 371: 299-306 (1986).

Ganzler K, Szinai I, Salgó A. *Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique*. J Chromatogr, 520: 257-262 (1990).

Garret ER, Seyda K. *Prediction of stability in pharmaceutical preparations. XX: Stability evaluation and bioanalysis of cocaine and benzyilecgonine by high-performance liquid chromatography*. J Clin Psychiatry, 51: 258-271 (1983).

Gergov M, Nokua P, Vuoni E, Ojamperä I. *Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 186: 36-43 (2009).

Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A. *Three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tricyclic antidepressant drugs: Comparison with conventional three-phase hollow fiber microextraction*. J Chromatogr A, 1222: 5-12 (2012).

Gonzalves Silva BJ, Lanzas FM, Costa Queiroz ME. *In tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma*, J Chromatogr B, 862: 181-188 (2008).

Govantes C, Oca L, Ayuso L. *Fármacos antidepresivos y antimaníacos en Velázquez BL "Farmacología básica y clínica"*. Edit Médica Panamericana, 18ª edic. Madrid, 2009.

Grabenuer M, Moore KN, Bynum ND, White RM, Mitchell JM, Hayes ED, Flegel R. *Development of a quantitative LC-MS-MS*

assay for codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone and oxymorphone in neat oral fluid. J Anal Toxicol, 1-8 (2018).

Greiner C, Hiemke C, Bader W, Haen E. *Determination of citalopram and escitalopram together with their active main metabolites desmethyl (es-)citalopram in human serum by column-switching high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric detection.* J Chromatogr B, 848: 391-394 (2007).

Grogg-Sulser K, Helmlin H-J, Clerc J-T. *Qualitative and quantitative determination of illicit heroin street samples by HPLC of reverse phase. Method by Cartagos.* J Chromatogr A, 692: 121-129 (1995).

Haeckel R, Hänecke P. *Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport.* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 34: 171-191 (1996).

Hall JE. *Guyton & Hall Tratado de Fisiología Médica.* 12 edic, Elsevier España SL, Barcelona, 2011.

Hamed R, Hadjmohammadi MR. *Optimization of alcohol-assisted dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design for the rapid determination of fluoxetine in biological samples.* J Sep Sci, 39: 4784-4793 (2016).

Hamidi F, Hadjmohammadi MR, Aghaie ABG. *Ultrasound-assisted dispersive magnetic solid phase extraction based on amino-functionalized Fe₃O₄ adsorbent for recovery of clomipramine from human plasma and its determination by high performance liquid chromatography: Optimization by experimental design.* J Chromatogr, 1063: 18-24 (2017).

Hasselstrøm J. *Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B, 879: 123-128 (2011).

Hearn WL, Flynn DD, Hime GW, Rose S, Co ino JC, Mantero-Atienza E, Wetli CV, Mash DC. *Cocaethylene: A unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter.* J Neurochem, 56: 698-701 (1991).

Heltsley R, DePriest A, Black DL, Robert T, Marshall L, Meadors VM y col. *Oral fluid drug testing of chronic pain patients. I. Positive*

prevalence rates of licit and illicit drugs. J Anal Toxicol, 35: 529-540 (2011).

Hill DW, Kind AJ. *Reversed-phase solvent gradient HPLC retention indexes of drugs*. J Anal Toxicol, 18: 23-242 (1994).

Huber L, George SA. (Ed). *Diode array detection in HPLC. Chromatographic Science Series*, vol.62. Ed. Marcel Dekker. New York. 1993.

Hummert K, Vetter W, Luckas B. *Fast and effective sample preparation for determination of organochlorine compounds in fatty tissue of marine mammals using microwave extraction*. Chromatographia, 42: 300-304 (1996).

Ide AH, Nogueira JMF. *New generation bar absorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach. Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids*. J Pharm Biomed Anal, 153: 126-134 (2018).

Ito R, Ushiro M, Takahashi Y, Saito K, Ookubo, Iwasaki Y, Nakazawa H. *Improvement and validation the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic anti-depressants in human urine samples*. J Chromatogr B 879: 3714-3720 (2011).

Jacob J, Boey F. *Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials*. J Materials Sci, 30: 5321-5327 (1995).

Jagerdeo E, Montgomery MA, Lebeau MA, Sibum M. *An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood*. J Chromatogr B, 874: 15-20 (2008).

Jatlow P, Nadim H. *Determination of cocaine concentrations in plasma by HPLC*. Clin Chem, 36: 8 (1990).

Jeffcoat AR, Pérez-Reyes M, Hill JM, Sadler BM, Cook CE. *Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking*. J Exp Pharmacol Ther, 17: 153-159 (1989).

Jenkins AJ, Keenan RM, Henningfield JE, Cone EJ. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin*. J Anal Toxicol, 18: 317-330 (1994).

Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. *Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma.* J Anal Toxicol, 19: 359-374 (1995).

Johansen SS, Bhatia HM. *Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B, 852: 338-344 (2007).

Juan H, Zhiling Z, Huande L. *Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI).* J Chromatogr B, 820: 33-39 (2005).

Kala SV, Harris SE, Freijo TD, Gerlich S. *Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Anal Toxicol, 32: 605-611 (2008).

Karch SB. *Introduction to the forensic pathology of cocaine.* Am J Forens Med Pathol, 12: 126-131 (1991).

Karch SB, Stephens B, Ho CH. *Relating cocaine blood concentrations to toxicity-an autopsy study of 99 cases.* J Forensic Sci, 43: 41-45 (1998).

Kidwell DA, Holland JC. *Testing for drugs of abuse in saliva and sweat.* J Chromatogr B, 713: 111-135 (1998).

Kircherr H, Kühn-Velten WN. *Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach.* J Chromatogr B, 843: 100-113 (2006).

Klaasen CD. *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons.* 8th Ed, McGraw-Hill Co, New York, 2013.

Klima M, Altenburger MJ, Kempf J, Auwärter V, Neukamm MA. *Determination of medicinal and illicit drugs in post mortem dental hard tissues and comparison with analytical results for body fluids and hair samples.* Forensic Sci Int 265: 166-171 (2016).

Koves EM. *Use of HPLC-diode array detection in forensic toxicology.* J Chromatogr A, 692: 103-119 (1995).

Kyriakou C, Marchei E, Scaravelli G, García-Algar O, Supervía A, Graziano S. *Identification and quantification of psychoactive drugs in whole blood using dried blood spot (DBS) by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 128: 53-60 (2016).

Lambert BM, Stewart JT. *Determination of cocaine and selected metabolites in canine and human serum by reversed-phase HPLC on coupled cyanopropyl and silica columns*. J Chromatogr, 495: 153-165 (1989).

Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. *Drug testing in oral fluid – Evaluation of sample collection devices*. J Anal Toxicol, 32: 393-401 (2008).

Lemos Pinto MA, De Souza ID, Queiroz MEC. *Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal 139: 116-124 (2017).

Levine B. (Ed). *Principles of forensic toxicology*. AACC Press. Washington, 2003.

Liao Q, Deng Y, Xie Z, Pan B, Zhang L. *Rapid simultaneous determination of codeine and morphine in plasma using LC-ESI-MS/MS: Application to a clinical pharmacokinetic study*. J Sep Sci, 32: 202-211 (2009).

Lili L, Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Zhang G. *Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 1217, 2365-2370 (2010).

Liu Y, Zheng B, Strafford S, Orugunti R, Sullivan M, Gus J, Heidbreder C, Fudala PJ, Nasser A. *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite (-) ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma*. J Chromatogr B 961. 77-85 (2014).

Logan BK, Stafford DT, Tebbet IR, Moore CM. *Rapid screening for 100 basis drugs and metabolites in urine using cation exchange*

solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. J Anal Toxicol, 14: 154-159 (1990).

López F, Álamo C. *Historia de la Psicofarmacología*. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2006.

Lorimer N, Schmid R. *The use of plasma levels to optimise methadone maintenance treatment*. Drug Alcohol Depend, 30: 241-246 (1994).

Lotfi Z, Mousavi HZ, Sajjadi SM. *Magnetic carbon nanotubes modified with 1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane are a viable sorbent for extraction of selective serotonin reuptake inhibitors*. Microchim Acta 184: 1427–1436 (2017).

Lund HME, Øiestad EL, Gjerde H, Christophersen AS. *Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits – Stability test-ing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis*. J Chromatogr B, 879: 3367-3377 (2011).

Maier, RD, Bogusz M. *Identification power of a standarized HPLC-DAD system for systematic toxicological analysis*. J Anal Toxicol, 19: 79-83 (1995).

Malagueño de Santana FJ, Moraes de Oliveira AE, Bonato PS. *Chiral liquid chromatography determination of mirtazapine in human plasma using two-phase liquid-phase microextraction*. Anal Chim Acta, 549: 96-103 (2005).

Malfará WR, Bertucci C, Costa Queiroz ME, Dreossi Carvalho SA, Pires Bianchi ML, Cesarino EJ, Crippa JA, Costa Queiroz RH. *Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants*. J Pharm Biomed Anal, 44: 955-962 (2007).

Marin SJ, Hughes JM, Lawlor BG, Clark CJ, McMillin GA. *Rapid Screening for 67 Drugs and Metabolites in Serum or Plasma by Accurate-Mass LC–TOF-MS*. J Anal Toxicol, 36: 477–486 (2012).

Mashayekhi A, Abroomand P, Saber-Tehrani M, Husain SW. *Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC*. Chromatographia, 71, 517-521 (2010).

Melis V, Usach I, Peris J-E. *Determination of sertraline in rat plasma by HPLC and fluorescence detection and its application to in vivo pharmacokinetic studies*. J Sep Sci, 35: 3302-3307 (2012).

Melwanki MB, Fuh M. *Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction and approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples*. J Chromatogr A, 1207, 24-28 (2008).

Mendoza Patiño N. *Farmacología Médica*. Edit Médica Panamericana, México DF, 2008.

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceutical, body fluids and postmortem material*. Ed. Pharmaceutical Press. Londres, 2004.

Montenarh D, Vernet MP, Hopf M, Maurer HH, Schmidt PH, Ewald AK. *Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS - comparative validation in whole blood, plasma, and serum*. Anal Bioanal Chem 406: 5939-5953 (2014).

Moolchan ET, Cone EJ, Wstadik A.; Huestis MA, Preston KL. *Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: Plasma and saliva analysis*. J Anal Toxicol, 24: 458-466 (2000).

Moors M, Massart DL, McDowall RD. *Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases. Classification and recommended practices*. Pure Applied Chem, 66(2): 277-304 (1994).

Moradi M, Yamini Y, Baheri T. *Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*. J Sep Sci, 34: 1722-1729 (2011).

Morrow PL, McQuillen JB. *Cerebral vasculitis associated with cocaine abuse*. J Forensic Sci, 38(3): 732-738 (1993).

Mulamed D. *Guidelines for saliva nomenclature and collections*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 694: XI-XII (1993).

Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. *An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites*. J Mass Spect, 41: 633-640 (2006).

Nakashima K. *High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples*. J Health Sci, 51: 272-277 (2005).

Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Roccia C, Sergi M. *Determination of illicit drugs in urine and plasma by Micro-SPE followed by HPLC–MS/MS*. *Chromatographia*, 75: 55-63 (2012).

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Omega Editor, 6º edic, Barcelona, 2014

Nolte KB, Brass LM, Fletterick CF. *Intracranial hemorrhage associated with cocaine abuse: a prospective autopsy study*. *Neurology*, 46: 1291-1296 (1996).

Nolte KB. *Rhabdomyolysis associated with cocaine abuse*. *Hum Pathol*, 22(11): 1141-1145 (1991).

Nováková L, Matysová L, Solich P. *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. *Talanta*, 68: 908-918 (2006).

Oberacher H, Schubert B, Libiseller K, Schweissgut A. *Detection and identification of drugs and toxicants in human body fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry under data-dependent acquisition control and automated database search*. *Anal Chim Acta*, 770: 121-131 (2013).

Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). *Informe 2018*. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Centro de Publicaciones, 2018.

Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT). *Informe Europeo sobre Drogas*. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, 2018.

Øiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. *Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Clin Chem* 53: 300-309 (2007).

Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. *Morphine and metabolite behaviour after different routes of administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine 6-glucuronide*. *Clin Pharm Ther*, 47:12-19 (1990).

Otto M. *Chemometrics: Statistics and computer. Application in Analytical Chemistry*. 2ª Ed. Wiley-VCH, Weinheim 2007.

Pan WJ, Hedaya MA. *Sensitive and specific HPLC assay with UV detection for the determination of cocaine and its metabolites in rat plasma*. *J Chromatogr B*, 703:129-138 (1997).

Pascual F, Torres M, Calafat A (Eds). *Monografía Cocaína. Adicciones*, vol 13, 2001.

Patel BN, Sharma N, Sanyal M, Shrivastava PS. *Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, N-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry method*. J Chromatogr B, 877: 221-229 (2009).

Pawliszyn J, Liu S. *Sample introduction for capillary gas chromatography with laser desorption and optical fibers*. Anal Chem, 59: 1475-1478 (1987).

Payte JT. *A brief history of methadone in the treatment of opioid dependence: a personal perspective*. J Psychoactive Drugs, 23: 103-107 (1991).

Potsch I, Skopp G, Emmerich TP, Becker J, Ogbuhui S. *Report on intrauterine exposure during second trimester of pregnancy in a heroin-associated death*. Ther Drug Monit, 21: 593-597 (1999).

Qin XY, Meng J, Li XY, Zhou J, Sun XL, Wen AD. *Determination of venlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography using cloud-point extraction and spectrofluorimetric detection*. J Chromatogr B, 872: 38-42 (2008).

Ramirez-Fernandez MM, Wille SMR, Kummer N, Di Fazio V, Ruysinckx E, Samyn N. *Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine, and their metabolites in human blood by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Ther Drug Monit, 35: 510-521 (2013).

Rang HP, Dale MN, Ritter JM. *Farmacología*. Edit Elsevier. 7ª edic. Barcelona, 2012.

Rani S, Kumar A, Malik AK, Singh B. *Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS*. Chromatographia, 74: 235-242 (2011).

Ranjbari E, Golbabanezhad-Azizi AA, Hadjmohammadi MR. *Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography*. Talanta, 94: 116-122 (2012).

Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. *Full validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric procedure for target screening and quantification of 34 antidepressants in human blood plasma as part of a comprehensive multi-analyte approach*. Anal Bioanal Chem, 400: 2093-2107 (2011).

Repetto M; Repetto G. *Toxicología fundamental*, 4ª Ed. Díaz de Santos. Madrid. 2009.

Retamal P. *Depresión*. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, 1998.

Retamal P. *Psicofarmacoterapia antidepresiva*. Rev Médica Chile v.129 n.7 Santiago. 2001.

Rezaee M, Assadi Y, Milani M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. J Chromatogr A, 1116: 1-9 (2006).

Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. *Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. Review*. J Chromatogr A, 1217: 2342-2357 (2010).

Ritschel WA, Thompson GA. *Monitoring of drug concentrations in saliva: a non.invasive pharmacokinetic procedure*. Meth Find Exp Clin Pharmacol, 5: 511-525 (1983).

Rodrigues Chaves A, Chiericato JG, Costa Queiroz ME. *Solid-phase microextraction using poly(pirrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples*. J Chromatogr B, 877: 587-593 (2009).

Rodríguez Chaves A, Leandro FZ, Carris JA, Queiroz MEC. *Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection*. J Chromatogr B, 878: 2123-2129 (2010).

Rodrigues Chaves A, Silva SM, Costa Queiroz RH, Lanças FM, Costa Queiroz ME. *Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples*. J Chromatogr B, 850: 295-302 (2007).

Röhrich J, Schmidt K, Kauert G. *Detection of drugs in saliva using the immunoassay triage*. Blutalkohol, 34: 102-114 (1997).

Rojtenberg S. *Depresión: una introducción a su estudio*, En Rojtenberg S. “Depresiones y antidepresivos”. Edit Médica Panamericana. Buenos Aires, 2001.

Rook EJ, Hillebrand JX, Rosing H, Van Ree JM, Beijnen JH. *The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 824: 213-221 (2005).

Roy IM and Jefferies, TM. *Performance evaluation of an aqueous-organic phase separator for post-column reactions in HPLC, and its application to the enhanced detection of some basic drugs of abuse*. J Pharm Biomed Anal, 8: 831-835 (1990).

Saber AL. *On-line phase extraction coupled to capillary LC-ESI-MS for determination of fluoxetine in human blood plasma*. Talanta, 78: 295-299 (2009).

Sadler Simões S, Castañera Ajenjo A, Dias MJ. *Dried blood spots combined to an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology*. J Pharm Biomed Anal, 147: 634-644 (2018).

Salazar M, Peralta C, Pastor J. *Tratado de Psicofarmacología: Bases y Aplicación Clínica*. Ed. Médica Panamericana, Madrid, 2005.

Samanidou VF, Anastasiadou K, Papadoyannis IN. *Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of methadone and its main metabolite EDDP in biological fluids, following SPE*. J Liq Chrom & Rel Technol, 29: 889-902 (2006).

Sánchez-González J, García-Carballal S, Cabarcos P, Tabernero MJ, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. *Determination of cocaine and its metabolites in plasma by porous membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1451: 15-22 (2016).

Sandberg JA, Olsen GD. *Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by High-Performance Liquid Chromatography*. J Chromatogr, 525: 113-121 (1990).

Saracino M, Mercolini L, Flotta G, Albers LJ, Merli R, Raggi MA. *Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B, 843: 227-233 (2006).

Saraji M, Boroujeni MK, Hajialiakbari AA. *Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography*. Anal Bioanal Chem, 400: 2149-2158 (2011).

Sawinok J. *The therapeutic use of heroin: a review of the pharmacological literature*. Can J Physiol Pharmacol, 64(1): 1-6 (1986).

Selavka CM, Krull IS, Lurie IS. *An improved method for the rapid screening of illicit cocaine preparations using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Forensic Sci Int, 31: 103-117 (1986).

Sempio C, Morini L, Vignali C, Groppi A. *Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on post mortem samples*. J Chromatogr B, 970: 1-7 (2014).

Sergi M, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Napoletano S, Risoluti R. *Micro-solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of stimulants, hallucinogens, ketamine and phenylcyclidine in oral fluids*. Anal Chim Acta, 675: 132-137 (2010).

Shakleya DM, Jansson LM, Huestis MA. *Validation of a LC-APCI-MS/MS method for quantification of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) and 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EMDP) in infant plasma following protein precipitation*. J Chromatogr B, 856: 267-272 (2007).

Shamsipur M, Mirmohammadi M. *High performance liquid chromatographic determination of ultratracés of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid-liquid microextraction coupled with response surface optimization*. J Pharm Biomed Anal, 100: 271-278 (2014).

Sharp ME, Wallace SM, Hindmarsh KW, Peel HW. *Monitoring saliva concentrations of methaqualone, codeine, secobarbital, diphenhydramine and diazepam after single oral doses*. J Anal Toxicol, 7: 11-14 (1983).

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw Hill, Madrid, 2008.

Skoog DA, West DM. *Fundamentos de Química Analítica*. Ed. Reverté. Barcelona, 1988.

Snyder LR, Kirkland JJ. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Ed. John Wiley and Sons. New York, 1979.

Speckl IM, Hallbach J, Guder WG, Meyer LV, Zilker T. *Opiate detection in saliva and urine-a prospective comparison by gas chromatography-mass spectrometry*. J Toxicol. Clin Toxicol, 37: 441-445 (1999).

Strano-Rossi S, Alvarez I, Tabernero MJ, Cabarcos P, Fernández P, Bermejo AM. *Determination of Fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC-MS*. J Appl Toxicol, 31: 649-654 (2011).

Suh JH, Lee YY, Lee HJ, Kang M, Hur Y, Lee SN, Yang D-H, Han SB. *Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma*. J Pharm Biomed Anal, 75: 214-219 (2013).

Sukbuntherng J, Walters A, Chow H, Mayersohn M. *Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by High Performance Liquid Chromatography*. J Pharm Sci, 84: 799-804 (1995).

Taylor K, Elliot S. *A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths*. Forensic Sci Int, 187: 34-41 (2009).

Teng X, Liang C, Wang R, Sun T, Rao Y, Ni C, Zeng L, Xiong L, Li Y, Zhang Y. *Screening of drugs of abuse and toxic compounds in human whole blood using online solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry*. J Sep Sci, 38: 50-59 (2015).

Theodoridis G, Papadoyannis I, Tsoukali-Papadopoulou H, Vasilkiotis G. *A comparative study of different solid phase extraction procedures for the analysis of alkaloids of forensic interest in biological fluids by RP-HPLC/Diode-array*. J Liq Chromatogr, 18: 1973-1995 (1995).

Thompson LK, Yousefnejad D, Kumor K, Sherer M, Cone EJ. *Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use*. J Anal Toxicol, 11: 36-38 (1987).

Thurman EM, Mills MS. *Solid-phase extraction: Principles and Practice*. Wiley. New York, 1998.

Toennes SW, Steinmeyer S, Maurer H, Moeller M, Kauert G. *Screening for drugs of abuse in oral fluid. Correlation of analysis results with serum forensic cases*. J Anal Toxicol, 29: 22-27 (2005).

Torres Bares C, Escarabajal Arrieta MD (2005) “*Psicofarmacología: Una aproximación histórica*”. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia, España. http://www.um.es/analesps/v21/v21_2/02-21_2.pdf

Tracqui A, Kintz P, Mangin P. *Systematic toxicological analysis using HPLC-DAD*. J Forensic Sci, 40: 254-262 (1995).

Trinler WA, Reuland DJ. *Rapid screening of street drugs by high pressure liquid chromatography: the screening of cocaine, heroin, methadone and morphine by reverse phase HPLC*. J Forensic Sci Soc, 15: 153-158 (1975).

Unceta N, Gómez-Caballero A, Sánchez A, Millán S, Sampedro MC, Goicolea MA, Sallés J, Barrio RJ. *Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 46: 763-770 (2008).

Unceta N, Ugarte A, Sánchez A, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. *Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples*. J Pharm Biomed Anal, 51: 178-185 (2010).

Urinovska R, Brozmanova H, Sistik P, Silhan P, Kacirova I, Lemr K, Grundmann M. *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry*

method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum. J Chromatogr B, 907: 101-107 (2012).

Vaghar-Lahijani G, Saber-Tehrani M, Aberoomand-Azar P, Soleimani M. *Extraction and determination of two antidepressant drugs in human plasma by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction-HPLC.* J Anal Chem, 73: 145-151 (2018).

Valen A, Øiestad, ÅML, Strand DH, Skari R, Berg T. *Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS.* Drug Test. Analysis, 9: 808-823 (2017).

Vincenti M, Cavanna D, Gerace E, Pirro V, Petrarulo M, Di Corcia D, Salomone A. *Fast screening of 88 pharmaceutical drugs and metabolites in whole blood by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Bioanal Chem, 405: 863-879 (2013).

Vindenes V, Enger A, Nordal K, Johansen U, Christophersen AS, Øiestad EL. *Very long detection times after high and repeated intake of heroin and methadone, measured in oral fluid.* Scandinavian Journal of Forensic Science. Nordisk Rettsmedisin, 20: 34-41 (2014).

Vlase L, Imre S, Leucuta S. *Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography.* Talanta, 66: 659-663 (2005).

Wang IT, Feng YT, Chen CY. *Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotope dilution ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations.* J Chromatogr B, 878: 3095-3105 (2010).

Way WL, Fields HL, Way EL. *Opioid analgesics and antagonists.* In: Katzung BG (Ed). Basic and clinical pharmacology. 7th ed. Prentice Hall Intern. New Jersey, 1998. pp. 496-515.

Westerling D, Sawe J, Eklundh G. *Near fatal intoxication with controlled-release morphine tablets in a depressed woman.* Acta Anaesthesiol Scand, 42: 586-589 (1998).

Wielbo D, Bhat R, Chari G, Vidyasagar D, Tebbett IR, Gulati A. *High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its metabolites in plasma using diode-array detection.* J Chromatogr, 615: 164-168 (1993).

Wietecha-Posluszni R, Garbacik A, Wozniakiewicz M, Moos A, Wieczorek M, Koscielniak P. *Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum*. Anal Bioanal Chem, 402: 2249-2257 (2012).

Wille SMR, Raes E, Lillsunde P, Gunnar T, Laloup M, Samyn N y col. *Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs*. Ther Drug Monit, 31: 511-519 (2009).

Williams CL, Laizure SC, Parker RB, Lima JJ. *Quantitation of cocaine and cocaethylene in canine serum by HPLC*. J Chromatogr B, 681: 271-276 (1996).

Wood M, Laloup M, Ramírez Fernández MM, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, De Boeck G, Samyn N. *Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 150: 227-238 (2005).

Wozniakiewicz M, Posłuszny RW, Moos A, Wieczorek M, Knihnicki P, Koscielniak P. *Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid*. J. Chromatogr. A, 1337: 9-16 (2014).

Wren SAC, Tchelitcheff P. *Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development*. J Chromatogr A, 1119: 140-146 (2006).

Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS. *Drugs in oral fluid. Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid*. Forensic Sci Int, 150: 191-198 (2005).

Xiong C, Ruan J, Cai Y, Tang Y. *Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 49: 572-578 (2009).

Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Yu Q, Feng Y. *Analysis of hexanal and heptanal in human blood by simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction then LC-APCI-MS-MS*. Chromatographia, 70: 775-781 (2009).

Zgota-Grzeskowiak A. *Application of DLLME to isolation and concentration of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples*. Chromatographia, 72: 671-678 (2010).

Zheng MM, Wang ST, Hu WK, Feng YQ. *In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma*. J Chromatogr A, 1217: 7493-7501 (2010).





2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El término *drogas de abuso* hace referencia a sustancias que se utilizan al margen de las indicaciones o dosis reconocidas (como los antidepresivos) o que son ilegales (como la cocaína y los opiáceos), cuyo consumo conlleva cuadros clínicos y de conducta caracterizados por tolerancia y dependencia.

En Europa, el consumo de drogas es una causa reconocida de mortalidad evitable entre los adultos, según el Informe de 2018 del *Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT)*. La droga estimulante ilegal más consumida en Europa es la cocaína, con mayor prevalencia en los países del sur y el oeste. Se estima que 17,5 millones de adultos europeos (entre 15 y 64 años) han consumido cocaína en algún momento de su vida (**Figura 2.1A**). Algunos indicadores, como la vigilancia de aguas residuales, las incautaciones y los datos sobre precios y pureza indican que la disponibilidad de cocaína podría haber aumentado en algunas partes de Europa. La heroína es el opiáceo más consumido en Europa (**Figura 2.1B**). Datos recientes indican que el 81% de la demanda de nuevos tratamientos por consumo de opiáceos en Europa está relacionada con la heroína. El tratamiento de sustitución, normalmente combinado con intervenciones psicosociales, es la modalidad terapéutica más frecuente en casos de dependencia de opiáceos en Europa. La metadona es el medicamento de sustitución prescrito con mayor frecuencia, ya que se administra al 63% de los consumidores tratados. Aquellos que inician o abandonan el tratamiento con frecuencia son especialmente vulnerables a una sobredosis.

En 2016 se calcula que se produjeron al menos 7.929 muertes por sobredosis en la *Unión Europea*, todas ellas relacionadas con alguna droga ilegal. El número de muertes por sobredosis aumentó entre 2012 y 2016 en los grupos de población de más de 30 años, y se mantuvo entre los grupos más jóvenes, reflejando el envejecimiento de la población consumidora de opiáceos. En la mayoría de las sobredosis mortales

notificadas en Europa, aparece la heroína y/o sus metabolitos, frecuentemente combinada con otras sustancias.

Según datos más recientes, se ha registrado un aumento en el número de muertes por heroína. Sin embargo, los estimulantes como la cocaína están asociados a un menor número de muertes por sobredosis, aunque su importancia varía de unos países a otros.

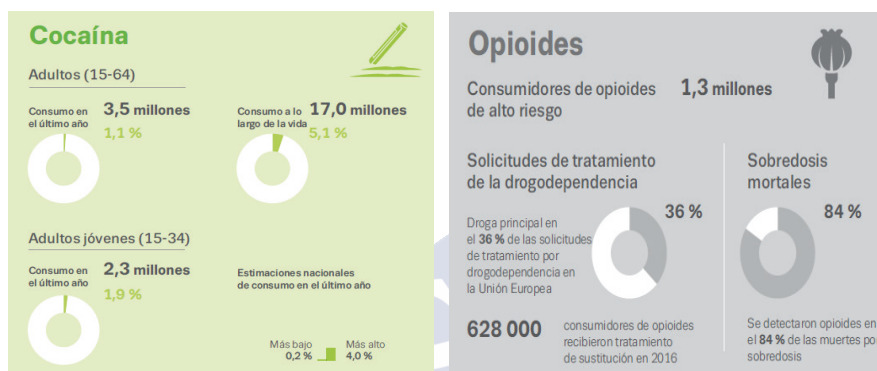


Figura 2.1. Estimaciones del consumo de drogas en la Unión Europea para cocaína (A) y opioides (B). Con permiso de OEDT, 2018.

El seguimiento del tratamiento o intoxicación/sobredosis correspondiente puede llevarse a cabo mediante la determinación analítica de estas sustancias o sus metabolitos en muestras biológicas. La automatización de los métodos de inmunoanálisis es una solución para:

- el cribado diagnóstico de consumo en ambientes laborales, donde legalmente se requiere la abstinencia.
- el seguimiento del tratamiento de la adicción.
- la detección de casos de sobredosis o de intoxicación en los servicios de urgencias médicas.

El resultado esperado es conocer la presencia o ausencia de droga o metabolitos que indiquen el consumo de la sustancia. También puede ser semicuantitativo, mediante la interpretación obtenida al establecer valores discriminantes. Las implicaciones legales de estos resultados recomiendan la verificación de éstos mediante métodos analíticos

cuantitativos más específicos y exactos, como los cromatográficos, incluyendo una etapa de preparación de muestra. La cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-DAD) es una técnica más eficaz comparada con el radioinmunoensayo (RIA) ya que permite diferenciar las drogas de sus metabolitos mediante sus espectros. Además, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es más rápida y sencilla, si se compara con la cromatografía de gases (GC), que requiere una etapa previa de derivatización para el análisis de algunas drogas.

La preparación de muestras para el análisis de drogas y fármacos es un continuo desafío para los analistas. En el análisis clínico y forense, cada caso es único y la naturaleza de las sustancias puede ser diferente o desconocida, por tanto es difícil estandarizar todo el procedimiento analítico. Además, la disponibilidad de la muestra es limitada en la mayoría de los casos.

La matriz de muestra utilizada depende del paciente/individuo y del tipo de análisis. Una de las más útiles para la identificación y cuantificación es la *sangre/plasma* porque proporciona información sobre la relación consumo/efecto de la droga de abuso determinada. Presenta inconvenientes como la toma invasiva de muestra, el volumen limitado y el tiempo de detección corto para algunas sustancias. Una matriz alternativa es la *saliva*, cuya toma de muestra es sencilla y no invasiva, permite analizar la droga original y proporciona información sobre un consumo reciente. Como desventajas, la saliva puede sufrir contaminación y su volumen también es limitado.

Como las drogas y sus metabolitos están generalmente presentes en niveles de trazas en los fluidos biológicos, todo el procedimiento analítico debe ser lo suficientemente sensible como para detectar y cuantificar los analitos con precisión y selectividad. Debido a la naturaleza extremadamente compleja de las muestras no se recomienda su introducción directa en un instrumento analítico para su análisis. Por lo tanto, se requiere una metodología de preparación de la muestra que la haga apta para el análisis instrumental. Para medidas precisas, la metodología propuesta debería:

- requerir una cantidad mínima de muestra para la extracción de las drogas de interés
- consumir la menor cantidad de disolventes orgánicos tóxicos
- ser eficiente en el tiempo
- proporcionar recuperaciones reproducibles
- producir un extracto limpio, sin impurezas e interferencias de matriz
- ser compatible para el acoplamiento con diferentes instrumentos analíticos.

El método más utilizado para la extracción y la concentración previa de analitos a partir de matrices toxicológicas es la extracción líquido-líquido (LLE), que es un proceso laborioso, requiere un paso de evaporación para eliminar el exceso de disolventes antes del análisis y, a veces, también un paso de purificación. La extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más comúnmente utilizada para eliminar interferencias y concentrar los analitos de interés en muestras biológicas líquidas, con un requerimiento menor de disolventes. Sin embargo, existen dispositivos comerciales que requieren pequeños volúmenes de disolventes para la extracción: *toxitubos* para LLE, que contienen disolventes y sales en proporciones ideales para el análisis de drogas, y *cartuchos* para SPE, rellenos con miligramos de fase estacionaria. Con el objetivo de mejorar las metodologías tradicionales de preparación de muestras, se han desarrollado *técnicas de microextracción* que requieren el uso de pocos microlitros de disolvente, así como menos tiempo y mano de obra, además de ser respetuosos con el medio ambiente. De este modo, la *microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)* es una miniaturización de la técnica de LLE y se utiliza ampliamente para la extracción de diversos tipos de analitos contenidos en diferentes matrices, desde su introducción en 2006.

El objetivo general de esta Memoria es el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de compuestos bioactivos en muestras biológicas de interés toxicológico. Para desarrollar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de metodologías analíticas basadas en cromatografía líquida de alta resolución para la identificación y determinación de drogas de abuso (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) en plasma y fluido oral.
2. Desarrollo de metodologías analíticas basadas en cromatografía líquida de ultra resolución para la identificación y determinación de antidepresivos (escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, mirtazapina, sertralina y venlafaxina) en plasma.
3. Desarrollo de procesos de preparación de muestra para el aislamiento de drogas de abuso en muestras de plasma y de fluido oral
4. Desarrollo de un proceso de preparación de muestra para extraer antidepresivos a partir de plasma, utilizando una herramienta quimiométrica, como es el diseño de experimentos, para estudiar y optimizar los principales factores que potencialmente afectan al proceso de extracción.
5. Validación de las metodologías analíticas propuestas y aplicación a muestras reales de plasma y saliva, todas ellas procedentes de sujetos consumidores de drogas y/o antidepresivos.



3. METODOLOGÍA

3.1. EQUIPOS

3.2. MATERIAL

3.3. PATRONES Y REACTIVOS

3.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

3.6. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FASE MÓVIL

3.7. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA

3.8. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL

3.9. ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

3.10. CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

3.10.1 Linealidad y Análisis de regresión.

3.10.2 Límites de detección y de cuantificación

3.10.3 Selectividad

3.10.4 Precisión y Exactitud

3.10.5 Recuperación

3.11. REFERENCIAS

3. METODOLOGÍA

3.1. EQUIPOS

- Cromatógrafo de líquidos Waters®, Modelo 2695
- Detector de array de fotodiodos Waters®, Modelo 996
- Acquity UPLC-H Class con Horno Waters®
- Detector Acquity de array de fotodiodos Waters®
- Software Empower Pro®
- Agitador magnético ARE (Velp Científica®)
- Agitador magnético HI 190M (Hanna Instruments®)
- Agitador mecánico Reax 2000 (Heidolph®)
- Balanza analítica BP61S (Sartorius®)
- Balanza de precisión S-2000 (Bosch®)
- Baño de ultrasonidos (Selecta®)
- Baño seco (VLMEC1®)
- Baño termostático Techne (Dri-Block® DB-1)
- Bomba de vacío (Waters-Millipore® Le Mont-sur-Lausanne, Suiza)
- Cámara frigorífica (Selecta®)
- Centrífuga miniSpin plus (Eppendorf®)
- Centrífuga MIXTASEL (Selecta®)
- Equipo de filtración (Waters-Millipore®)
- Estufa (Selecta®)
- Manifold Visiprep™ DL (Supelco®)
- pH-metro BASIC 20 (Crison®)

3.2. MATERIAL

- Barras agitadoras
- Cartuchos de extracción Bond-Elut Certify, 130 mg, 3ml (Varian®)
- Cartuchos de extracción Oasis HLB, 130 mg, 3mL (Varian®)
- Embudos de vidrio

- Espátulas
- Filtros HV 0.45 μm (Waters-Millipore®)
- Frascos de vidrio para las disoluciones patrón y la fase móvil
- Frascos lavadores
- Gradillas
- Matraces aforados de 5, 10, 20, 50 y 1000 mL
- Microjeringa de 100 μL (Hamilton®)
- Micropipetas automáticas de 2-20 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 500-5000 μL y 1-10 mL (Eppendorf®)
- Papel de filtro
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 5, 10, 100, 500 y 1000 mL
- Salivettes (Sarstedt® Numbrecht, Alemania)
- Toxítubos A (Dipesa®)
- Tubos cónicos (Pirex®)
- Tubos de vidrio para centrifuga
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitados de 25, 100, 250 y 1000 mL

3.3. PATRONES Y REACTIVOS

- 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina(EDDP)(Cerilliant®, Round Rock, USA.)
- 6-Acetilmorfina (6AM) (Cerilliant®)
- Benzoilecgonina (BEG) (Cerilliant®)
- Cocaetileno (Cerilliant®)
- Cocaína (Cerilliant®)
- Codeína (Cerilliant®)
- Escitalopram (Laboratorio Lundbeck®)
- Fluoxetina (Laboratorio Normon®)
- Fluvoxamina (Laboratorio Solvay Pharma®)
- Metadona (Cerilliant®)
- Mirtazapina (Laboratorio Normon®)
- Morfina (Cerilliant®)
- Sertralina (Laboratorio Pfizer®)
- Venlafaxina (Laboratorio Normon®)

- Acetona grado LiChrosolv (Merck®)
- Acetonitrilo LiChrosolv grado gradiente (Merck®)
- Ácido acético glacial p.a. (Merck®)
- Ácido clorhídrico p.a. (Merck®)
- Ácido fosfórico p.a. (Merck®)
- Agua Milli-Q (Millipore®)
- Amoníaco p.a. (Merck®)
- Clorobenceno p.a. (Merck®)
- Cloroformo Lichrosolv grado gradiente (Merck®)
- Dicloroetano p.a. (Merck®)
- Diclorometano p.a. (Merck®)
- Hidróxido potásico p.a. (Merck®)
- Hidróxido sódico p.a. (Merck®)
- Isopropanol p.a. (Merck®)
- Metanol LiChrosolv grado gradiente (Merck®)
- Potasio dihidrógeno fosfato p.a. (Merck®)
- Sodio monohidrógeno fosfato p.a. (Merck®)
- Sulfato sódico anhidro p.a. (Merck®)
- Tampón fosfato 0,1M pH 6
- Tetracloruro de carbono p.a. (Merck®)

3.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS

- **Plasma** blanco, libre de drogas, procedente del Centro de Transfusión de Galicia, y muestras de plasma procedentes de sujetos consumidores de drogas o de antidepresivos.
- **Saliva** blanco, libre de drogas, procedente de donantes voluntarios no consumidores de drogas, y muestras de saliva procedentes de individuos consumidores de drogas que están dentro de un programa de desintoxicación de la Unidad de cuidado de la salud de drogadictos (*Drug Addict Health Care Unit*) de Galicia. Todas las muestras se recogen con los Salivetes®. Estos dispositivos comerciales contienen un hisopo de algodón que se mantiene en la boca durante 2-3 minutos, después se coloca en un tubo de recogida y se centrifuga para liberar la saliva (**Figura 3.1**).



Figura 3.1. Fases en la recogida de muestras de fluido oral.
Con permiso de Sarsted® Nümbrecht, Alemania.

A su llegada al laboratorio, todas las muestras de plasma y saliva son almacenadas a 4°C si el análisis va a realizarse en los 2 días siguientes, o son congeladas a -18°C en caso contrario, con el fin de evitar el deterioro de las mismas. Las pruebas se realizan de acuerdo con los “Principios éticos para la Investigación médica implicando seres humanos” (**World Medical Association; J Am Med Assoc 2013**), de la Asociación Médica Mundial, y con la Legislación Nacional Española.

3.5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Cromatografía de líquidos (Waters®).
- Software (drogas de abuso): Millenium 32®, Versión 3.05.01 for Windows 98 (Waters®).
- Software (antidepresivos): Empower-Pro®, Versión 3.05.01 for Windows 98 (Waters®).
- Columna cromatográfica (drogas de abuso): XTerra® RP8 (250mm x 4,6mm, 5µm).
- Columna cromatográfica (antidepresivos): Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100mm x 2,1mm, 1,7µm).
- Volumen de inyección: 20 µL.

- Tiempo de análisis (drogas de abuso): 22 min.
- Tiempo de análisis (antidepresivos): 2,5 min.
- Presión mínima: 8 psi. Presión máxima: 4000 psi.
- Fase móvil (drogas de abuso): Acetonitrilo/Tampón KH_2PO_4 20mM, pH 6,5 en régimen de gradiente (**Tabla 3.1**).
- Fase móvil (antidepresivos): Acetonitrilo/Tampón KH_2PO_4 50mM, pH 3 en régimen de gradiente (**Tabla 3.2**)

Tabla 3.1. Gradiente de la fase móvil en HPLC (Drogas de abuso en plasma usando SPE y en fluido oral usando Toxitubos A)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
0	0,7	10	90
5	0,7	15	85
7	0,8	20	80
10	0,8	35	65
15	0,8	50	50
20	0,8	50	50
22	0,7	10	90

A: Acetonitrilo; B: Tampón fosfato pH=6,5

Tabla 3.2 Gradiente de la fase móvil en UPLC (Antidepresivos en plasma usando DLLME)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
0	0,4	20	80
0,7	0,4	40	60
1,8	0,4	45	55
2,0	0,4	30	70
2,2	0,4	25	75
3,0	0,4	20	80

A: Acetonitrilo; B: Tampón fosfato pH=3,0

Detector: Espectrofotómetro de red de diodos Waters® 996 que proporciona un espectro de absorción desde 190 a 800 nm en la región

ultravioleta-visible del espectro electromagnético, del que se registra el intervalo 200-400 nm. Se seleccionaron las longitudes de onda de absorción máxima:

- 233 nm para cocaína, BEG y cocaetileno
- 292 nm para metadona y EDDP
- 285 nm para morfina, codeína y 6AM
- 239,3 nm para escitalopram
- 227,0 nm para fluoxetina
- 252,1 nm para fluvoxamina
- 250,9 nm para mirtazapina
- 273,6 nm para sertralina
- 225,8 nm para venlafaxina

3.6. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FASE MOVIL

A partir de las disoluciones de trabajo se preparan las disoluciones seleccionadas para la calibración en fase móvil: 0,5; 1; 2; 5; 10 y 20 µg/mL. Entre paréntesis se muestran las concentraciones de las disoluciones de partida (**Tabla 3.3**). De cada disolución-mezcla conteniendo todas las drogas, se inyectan 20 µL en el cromatógrafo y se construye la recta de calibrado representando el área de los picos frente a las concentraciones de los analitos. Para cada nivel se hicieron tres recalibraciones y se obtuvieron las rectas correspondientes a cada compuesto, mediante el método de ajuste de mínimos cuadrados.

Tabla 3.3. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en fase móvil.

Concentración final (µg/mL)	Volumen de disolución patrón de cada droga (µL)	Volumen final (µL)
0,5	5 (50 µg/mL)	500
1,0	10 (50 µg/mL)	500
2,0	20 (50 µg/mL)	500
5,0	25 (100 µg/mL)	500
10,0	25 (200 µg/mL)	500
20,0	50 (200 µg/mL)	500

3.7. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA

En primer lugar, se preparan disoluciones patrón de 1 mg/mL de cada una de las drogas en metanol (morfina, codeína, benzoilecgonina, metadona y EDDP) o en acetonitrilo (cocaína, cocaetileno y 6AM), para mejorar la estabilidad en el disolvente. A continuación y a partir de estas disoluciones, se preparan las disoluciones de trabajo, diluyendo 1:5 (concentración 200 µg/mL), 1:10 (concentración 100 µg/mL), 1:20 (concentración 50 µg/mL) y 1:100 (concentración 10 µg/mL) en metanol o acetonitrilo. La **Tabla 3.4** indica la preparación de las disoluciones–mezcla de todas las drogas objeto de estudio en plasma.

Tabla 3.4. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en plasma (SPE).

Concentración inicial plasma (µg/mL)	Volumen de disolución patrón de cada droga (µL)	Plasma c.s.p. (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final (µg/mL)
0,1	10 (10 µg/mL)	1000	100	1,0
0,2	20 (10 µg/mL)	1000	100	2,0
0,5	10 (50 µg/mL)	1000	100	5,0
1	10 (100 µg/mL)	1000	100	10,0
2	10 (200 µg/mL)	1000	100	20,0
5	25 (200 µg/mL)	1000	100	50,0

Extracción en fase sólida (SPE):

El plasma se ultracentrifuga durante 10 min a 14000 rpm para separar compuestos, que pudieran ser coextraídos provocando efecto matriz, y se procede a la extracción usando un Manifold y cartuchos Bond-Elut Certify (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5. Protocolo de SPE para drogas de abuso en plasma

ACONDICIONADO DE LA COLUMNA	2 mL metanol grado HPLC 2 mL tampón fosfato 0,1M pH 6
CARGA DE LA MUESTRA	1 mL plasma
LAVADO	3 mL agua MilliQ 3 mL HCl 0,1M 9 mL metanol grado HPLC 3 mL NH ₄ OH 0,3M
SECADO	Aplicar vacío durante 5 minutos
ELUCIÓN	3 mL cloroformo-isopropanol (4:1)
EVAPORACIÓN A SEQUEZAD	Baño a 40°C, bajo corriente de N ₂
RECONSTITUCIÓN DEL EXTRACTO SECO	100 µL de fase móvil

Finalmente, se inyectan 20 µL del extracto seco reconstituido, en el cromatógrafo de líquidos. Las disoluciones postextracción son 10 veces más concentradas que las del plasma de partida.

Después de aplicar el procedimiento de extracción en fase sólida a las disoluciones plasmáticas reflejadas en la **Tabla 3.4**, se procede a su análisis usando la cromatografía de líquidos con detector de array de diodos, y se construyen las rectas de calibrado, representando las áreas de los picos correspondientes a cada analito frente a las concentraciones (N=5) de las ocho drogas en estudio. También se aplicó este método en muestras de plasma procedentes de sujetos consumidores de cocaína, heroína y/o metadona.

En esta investigación, no se incluye la documentación relacionada con las normas éticas actualmente vigentes porque en el momento de la realización de este trabajo esta normativa no estaba en vigor.

3.8. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL

En primer lugar, se preparan disoluciones patrón de 1 mg/mL de cada una de las drogas en metanol (morfina, benzoilecgonina, metadona y EDDP) o en acetonitrilo (cocaína, cocaetileno y 6AM), para mejorar la

estabilidad en el disolvente. A continuación, y a partir de estas disoluciones, se preparan las disoluciones de trabajo, diluyendo 1:5 (concentración 200 $\mu\text{g/mL}$), 1:10 (concentración 100 $\mu\text{g/mL}$), 1:20 (concentración 50 $\mu\text{g/mL}$) y 1:100 (concentración 10 $\mu\text{g/mL}$) en metanol o acetonitrilo. La **Tabla 3.6** explica la preparación de las disoluciones–mezcla de todas las drogas objeto de estudio en fluido oral (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$).

Tabla 3.6. Preparación de disoluciones de calibrado de drogas de abuso en fluido oral (Toxítubos A)

Concentración inicial saliva ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen disolución patrón de cada droga (μL)	Saliva c.s.p. (μL)	Volumen final (μL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
0,05	5 (10 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	0,5
0,1	10 (10 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	1,0
0,2	20 (10 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	2,0
0,5	10 (50 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	5,0
1,0	10 (100 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	10,0
2,0	10 (200 $\mu\text{g/mL}$)	1000	100	20,0

Extracción con Toxítubos A:

Estos dispositivos comerciales contienen una solución tampón con un pH 9 y una mezcla de disolventes orgánicos (diclorometano, 1,2-dicloroetano, heptano e isopropanol) para extraer sustancias orgánicas de carácter básico. Se añade 1 mL de fluido oral en el Toxítubo, y se agita durante 10 minutos para luego centrifugar a 4000 rpm unos 15 minutos. La fase orgánica se evapora a seco en un baño a 40°C, bajo corriente de Nitrógeno, y el extracto se reconstituye en 100 μL de fase móvil. Finalmente, se inyectan 20 μL en el cromatógrafo para su análisis (**Figura 3.2**). Las disoluciones postextracción son 10 veces más concentradas que las iniciales en fluido oral.



Figura 3.2. Proceso de extracción con Toxitubos A para drogas de abuso en fluido oral

Se realizan cinco recalibraciones para cada nivel de concentración reflejado en la **Tabla 3.6** y se construyen las rectas de calibrado representando las áreas de los picos frente a las concentraciones de las siete drogas objeto de estudio. También se aplicó este método en muestras de fluido oral procedentes de sujetos consumidores de cocaína, heroína y/o metadona.

En esta investigación, no se incluye la documentación relacionada con las normas éticas actualmente vigentes porque en el momento de la realización de este trabajo esta normativa no estaba en vigor.

3.9. ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

En primer lugar, se preparan disoluciones patrón de 1 mg/mL de cada uno de los antidepresivos en metanol. A partir de estas disoluciones se preparan otras disoluciones-mezcla de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 y 100 µg/mL, que se utilizan para la preparación de las disoluciones-mezcla en plasma (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.7. Preparación de disoluciones de calibrado de antidepresivos en plasma (DLLME)

Volumen disolución-mezcla (μL)	Volumen plasma (μL)	Concent inicial (μg/mL)	Volumen final (μL)	Concent final (μg/mL)
20 (1 μg/mL)	500	0,04	100	0,2
20 (2,5 μg/mL)	500	0,1	100	0,5
20 (5 μg/mL)	500	0,2	100	1
20 (10 μg/mL)	500	0,4	100	2
20 (25 μg/mL)	500	1	100	5
20 (50 μg/mL)	500	2	100	10
20 (100 μg/mL)	500	4	100	20

Microextracción Líquido Líquido Dispersiva (DLLME):

A 500 μL de plasma conteniendo los antidepresivos se le añaden 2,5 mL de acetonitrilo (agente dispersante, que precipita proteínas plasmáticas), se centrifuga, se recoge el sobrenadante, se le añade 200 μL de cloroformo (agente extractante), se mezcla y se añade en 4,5 mL de agua Milli-Q. Se añade una disolución de NaOH para conseguir el pH de la extracción (9,8). Una vez hecho esto se colocan los tubos en un baño de ultrasonidos (US) durante 3 minutos, y luego se centrifugan 10 minutos a 4000 rpm. Finalmente se extrae la gota (560 μL), se evapora a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se reconstituye con 100 μL de fase móvil para inyectar 30 μL en el cromatógrafo (**Figura 3.3**). La disolución post-extracción (100 μL) es 5 veces más concentrada que la disolución inicial (500 μL de plasma).

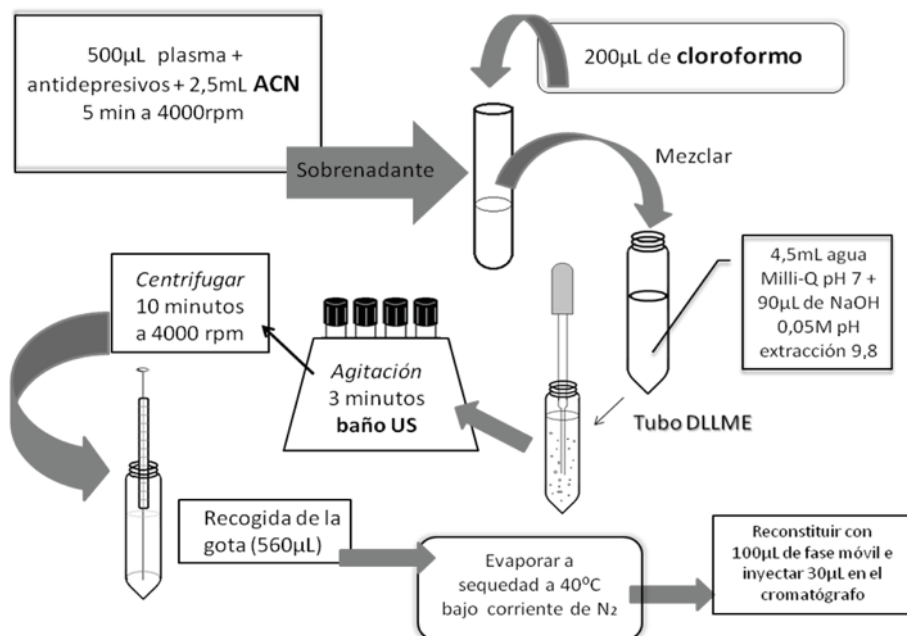


Figura 3.3. Proceso de la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) para antidepresivos en plasma

Se realizan cinco recalibraciones para cada nivel de concentración reflejado en la Tabla 3.7 y se construyen las rectas de calibrado representando las áreas de los picos frente a las concentraciones de los seis antidepresivos en estudio. También se aplicó este método en muestras de plasma procedentes de sujetos consumidores de escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, mirtazapina, sertralina y/o venlafaxina.

Esta investigación fue realizada de acuerdo con las normas éticas vigentes en el momento de la realización de este trabajo.

3.10. CRITERIOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

La validación de un método requiere demostrar que el análisis cuantitativo de los compuestos en una matriz biológica es fiable dentro de un margen

de error determinado y adecuado para la resolución de problemas analíticos. Solamente los métodos validados permiten asegurar como ciertos los resultados obtenidos.

Los criterios seguidos en este trabajo son los recomendados por organizaciones como la **FDA** (Food and Drug Administration) o la **ICH** (International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), que promueven recomendaciones y guías para la comunidad científica en general, y para la industria farmacéutica, en particular (**Peters y Maurer, 2002; Shah y col, 2000**). Para la realización de la validación es necesaria la determinación de los parámetros:

- Linealidad y análisis de regresión.
- Límites de detección y cuantificación.
- Selectividad.
- Precisión y exactitud
- Recuperación

3.10.1. Linealidad y Análisis de regresión

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad de éste para obtener respuestas linealmente proporcionales a la concentración de analito en un intervalo determinado que incluya el límite de cuantificación y de seis a ocho niveles que cubran el rango esperado. El estudio de linealidad requiere la realización de curvas de calibrado, que han de ser realizadas para cada uno de los analitos en la matriz biológica correspondiente y obtenidas mediante la representación gráfica de las áreas de los picos cromatográficos resultantes frente a la concentración conocida del analito.

Empleando el método de ajuste de mínimos cuadrados se han obtenido las rectas de regresión, que son del tipo: $Y = AX + B$, donde “Y” es la relación de áreas de cada compuesto, “X” es la concentración expresada en $\mu\text{g/mL}$, “A” es la pendiente y “B” es la ordenada en el origen. Los coeficientes de correlación (R) reflejan el grado de relación entre las variables estudiadas, al igual que los coeficientes de determinación (R^2) que indican la calidad del ajuste de los puntos a una recta, cuyos valores oscilan entre 0 (no ajuste) y 1 (ajuste total). De este modo, cuánto más se acerque a 1 dicho parámetro, más se aproximará la distribución de los puntos a una recta. Para verificar la linealidad se debe comprobar que la pendiente de

la recta de calibrado sea estadísticamente distinta de cero y que el término independiente no sea estadísticamente distinto de cero (**Bressolle y col, 1996**), calculando en cada caso los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen.

3.10.2. Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección (LOD) es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de detección se calcula realizando un mínimo de cinco determinaciones y utilizando las ecuaciones siguientes:

$$\text{LOD: } S/R = 3; \quad Y_{\text{LOD}} = 3Y_b$$

donde S/R es la relación señal/ruido e Y_b representa la señal de un blanco cuyos picos definen el ruido medio estimado para cada compuesto. A continuación, sustituyendo la señal en la ecuación de la recta de calibrado, se obtiene:

$$Y_{\text{LOD}} = aX_{\text{LOD}} + b$$

El límite de cuantificación (LOQ) es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas (**Bressolle y col, 1996**). Se acepta como límite inferior de cuantificación la concentración más baja de las rectas de calibrado, si cumple las siguientes condiciones: la respuesta del analito en el LOQ es por lo menos cinco veces superior a la respuesta del blanco y el pico del analito debe ser identificable y reproducible con una precisión de 20% y una exactitud del 80-120% (**Shah y col, 2000; Peters y Maurer, 2002**).

3.10.3. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para distinguir y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. El método más sencillo para validar la selectividad en análisis

cromatográficos es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de la matriz biológica (plasma y saliva); para ello se debe realizar el análisis de al menos cinco muestras blanco de diferente procedencia y se examinan con cuidado los cromatogramas a los tiempos de retención de los analitos de interés para comprobar que no existen interferencias con el método analítico (**Karnes y col, 1991; Bressolle y col, 1996**). Las interferencias pueden deberse a componentes endógenos presentes en las matrices biológicas, o a otras drogas o fármacos consumidos por el individuo.

3.10.4. Precisión y Exactitud

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos de una muestra homogénea. Se evalúa mediante un estudio de reproducibilidad como mínimo a dos niveles de concentración de los compuestos investigados, desarrollando cinco series de extracciones para cada punto estudiado de las rectas de calibrado. La precisión se expresa como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, aceptando como buenos los resultados menores al 15%:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

siendo \bar{x} el valor de la media y s la desviación estándar.

El coeficiente de variación calculado para cada nivel de concentración no debe superar el 15%, a excepción del LOQ donde no debe exceder del 20%, como criterio de validación. Existen dos tipos: intra-día o repetibilidad, que determina la precisión durante el procesado de una sola secuencia de datos, e inter-día o reproducibilidad que refleja la precisión en el tiempo.

La exactitud es la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero, y fue calculada como la diferencia porcentual entre la concentración medida y su valor nominal. Puesto que el procedimiento empleado consta de dos fases (extracción y calibración), pueden obtenerse desviaciones por defecto.

El estudio de la exactitud también se realizó en base a los resultados correspondientes a las cinco series de extracciones para dos niveles de concentración, como mínimo:

$$E_r = \left| \frac{\bar{x} - x_1}{x_1} \right| \times 100$$

siendo \bar{x} el valor de la media y x_1 el valor teórico.

Se aceptan como válidos los valores incluidos dentro de una desviación o error medio relativo de $\pm 15\%$, excepto en el LOQ, donde la desviación no debe superar el 20%, para su uso como criterio de validación (FDA, 2001; Shah y col, 2000; Peters y Maurer, 2002).

3.10.5. Recuperación

La recuperación es la relación porcentual entre la respuesta del detector obtenida a partir de una cantidad de analito añadido y posteriormente extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta de ese mismo detector obtenida para la concentración verdadera de la sustancia estándar pura. La recuperación proporciona la idea de la eficacia de la extracción de un método analítico dentro de unos límites de variabilidad. La recuperación del analito no tiene por qué ser del 100%, pero sí debe ser constante, exacta y reproducible (Bressolle y col, 1996). Después del proceso de extracción, cinco muestras conteniendo las drogas fueron analizadas en el cromatógrafo y a otras cinco muestras blanco se les añadió la cantidad exacta del analito para conseguir la concentración teórica máxima antes de ser medidas en el cromatógrafo. La recuperación se calcula comparando las áreas de cada analito en las primeras cinco muestras (drogas extraídas), con las áreas de cada analito en las otras cinco muestras (que representaban el 100% del analito).

3.11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bresolle F, Bromet--Petit M, Audran M. *Validation of liquid chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics*. J Chromatogr, 686: 3-10 (1996).

Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>

International Conference of Harmonization (ICH). *Validation of analytical methods: Definitions and terminology*. ICH Q2A, 1994.

International Conference of Harmonization (ICH). *Validation of analytical methods: Definitions and terminology*. ICH Q2B, 1996.

Karnes HT, Shiu G, Shah VP. *Validation of bioanalytical methods*. Pharm Research, 8: 421-426 (1991).

Peters FT, Maurer HH. *Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review*. Accred Qual Assur, 7: 441-449 (2002).

Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. *Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress*. Pharmaceutical Research, 17: 1551-1557 (2000).

World Medical Association. *Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*. JAMA - J. Am. Med. Assoc. 2013; 310: 2191-2194

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO

4.2. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA

4.2.1. Optimización de la Extracción en Fase Sólida (SPE)

4.2.2. Validación del Método Analítico

4.2.2.1 Linealidad del método

4.2.2.2 Límites de detección y cuantificación

4.2.2.3 Precisión y exactitud

4.2.2.4 Recuperación

4.2.2.5 Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas

4.2.3. Referencias

4.3. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL

4.3.1. Optimización de la Extracción Líquido-Líquido (LLE)

4.3.2. Validación del Método Analítico

4.3.2.1 Linealidad del método

4.3.2.2 Límites de detección y cuantificación

4.3.2.3 Precisión, Exactitud y Recuperación

4.3.2.4 Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas .

4.3.3. Referencias

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTIDEPRESIVOS

4.5 ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

- 4.5.1. Optimización de la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). Diseño Experimental
 - 4.5.1.1 Estudio del dispersante
 - 4.5.1.2 Estudio del extractante
 - 4.5.1.3 Estudio del modo de agitación
 - 4.5.1.4 Estudio de la adición de sal
 - 4.5.1.5 Diseño de screening
 - 4.5.1.6 Diseño de superficie de respuesta
- 4.5.2. Validación de los Métodos Analíticos
 - 4.5.2.1 Validación del Método Analítico (UPLC-PDA)
 - 4.5.2.1.1 Linealidad y Análisis de regresión
 - 4.5.2.1.2 Límites de detección y cuantificación
 - 4.5.2.1.3 Selectividad
 - 4.5.2.1.4 Precisión, Exactitud y Recuperación
 - 4.5.2.1.5 Aplicación del método a casos reales de intoxicación
 - 4.5.2.2 Validación del Método Analítico (UPLC-MS/MS)
 - 4.5.2.2.1 Linealidad
 - 4.5.2.2.2 Límites de detección y cuantificación
 - 4.5.2.2.3 Precisión, Exactitud y Recuperación
- 4.5.3 Referencias

4.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO

La identificación de las drogas de abuso se ha hecho en base a sus tiempos de retención y a sus espectros de absorción (**Figuras 4.1 - 4.3**), que permiten seleccionar la longitud de onda a la cual la respuesta cromatográfica es máxima para cada analito.

En primer lugar, se optimizaron las condiciones cromatográficas para separar e identificar morfina, codeína, 6-acetilmorfina (6AM), cocaína, benzoilecgonina (BEG), cocaetileno (CET), metadona y EDDP. En primer lugar se estudió la idoneidad de seis columnas cromatográficas (μ Bondapak C18, Sunfire C18, Hypersil BDS C18, Kromasil C8, Spherisorb C8 y XTerra RP8), utilizando siempre la fase móvil propuesta por **Logan y Stafford (1990)**:

*Las columnas μ Bondapak C18 (300x3,9mm, 5 μ m), *Sunfire C18* (250x4,6 mm, 5 μ m) e *Hypersil BDS C18* (150x4,6mm, 5 μ m) fueron rechazadas porque se obtuvo una mala resolución de los derivados opiáceos y una baja sensibilidad para todos los compuestos en estudio.

*Las columnas *Kromasil C8* (250x4,6mm, 5 μ m) y *Spherisorb C8* (250x4,0 mm, 5 μ m) también fueron descartadas porque proporcionaron picos desdoblados para cocaetileno, metadona y EDDP.

*La columna *XTerra RP8* (250x4,6mm, 5 μ m) fue la seleccionada porque permitió obtener una separación de los picos cromatográficos con buena resolución y una adecuada sensibilidad para la respuesta cromatográfica de los compuestos.

A continuación, y usando la columna *XTerra RP8* (250x4,6mm, 5 μ m), se probaron diferentes fases móviles:

*La mezcla acetonitrilo-tampón fosfato 20mM de pH 3,2 a diferentes gradientes no permitió una buena separación de las drogas.

*Partiendo de la fase móvil anterior, se modificó la sal utilizada para la preparación del tampón (fosfato disódico, fosfato monosódico, acetato amónico, fosfato trietilamónico), su concentración, su pH, el disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol), el flujo y el gradiente utilizados por otros autores (**Theodoridis y col, 1995; Achilli y col, 1996**).

*Finalmente, fue seleccionada la fase móvil compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato 20mM, pH 6,5 en régimen de gradiente (**Tabla 3.1**) porque consigue las mejores respuestas y una óptima resolución de

los picos del cromatograma, separando los ocho compuestos en un tiempo inferior a 20 minutos.

Las **Figuras 4.4 - 4.6** muestran los cromatogramas bidimensionales (absorbancia / tiempo), obtenidos a las tres longitudes de onda de trabajo, para una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de las ocho drogas estudiadas en fase móvil.

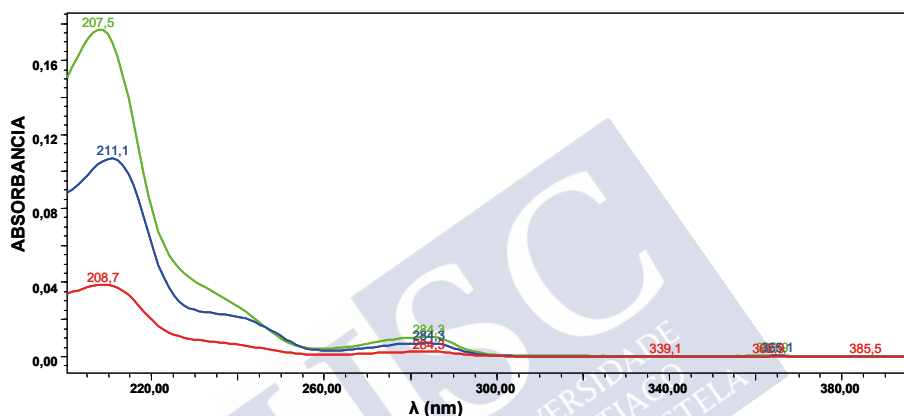


Figura 4.1. Espectros de Morfina (rojo), Codeína (azul) y 6AM (verde)

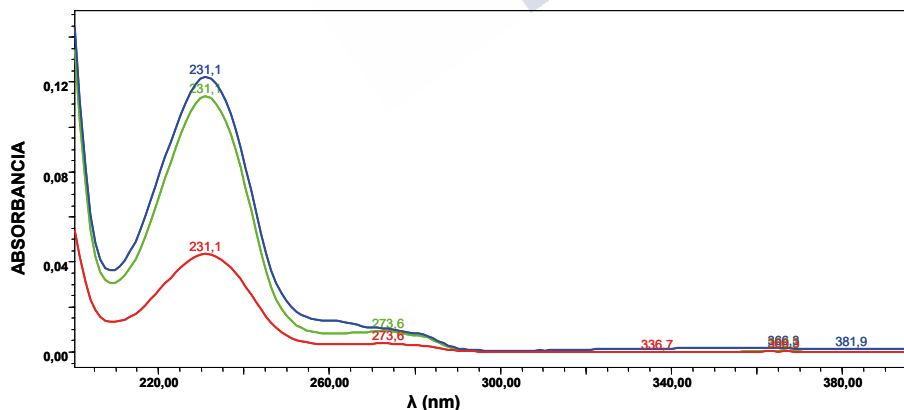


Figura 4.2. Espectros de Cocaína (azul), Cocaetileno (verde) y BEG (rojo)

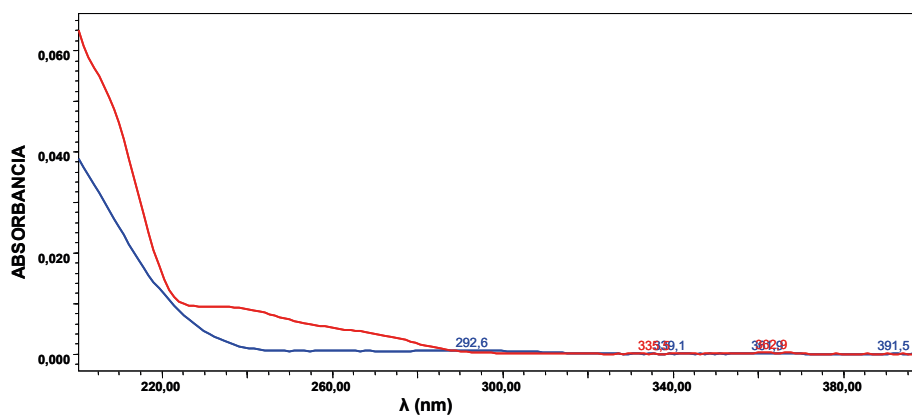


Figura 4.3. Espectros de Metadona (azul) y EDDP (rojo)

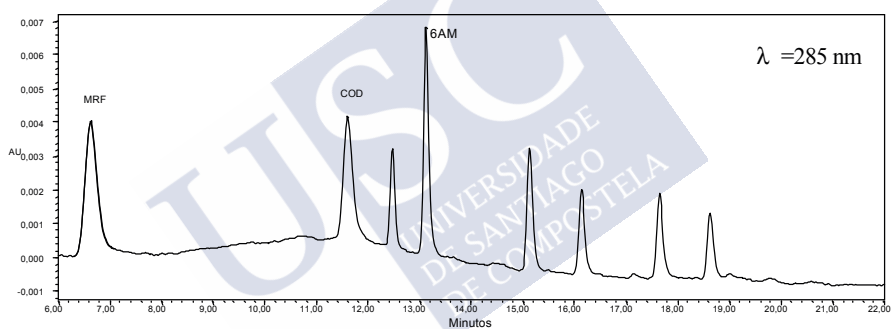


Figura 4.4. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM en fase móvil

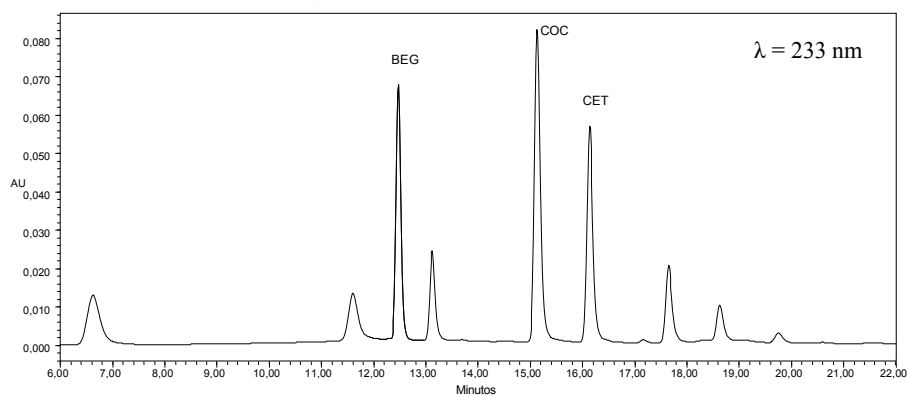


Figura 4.5. Cromatograma de BEG, Cocaina y Cocaetileno en fase móvil

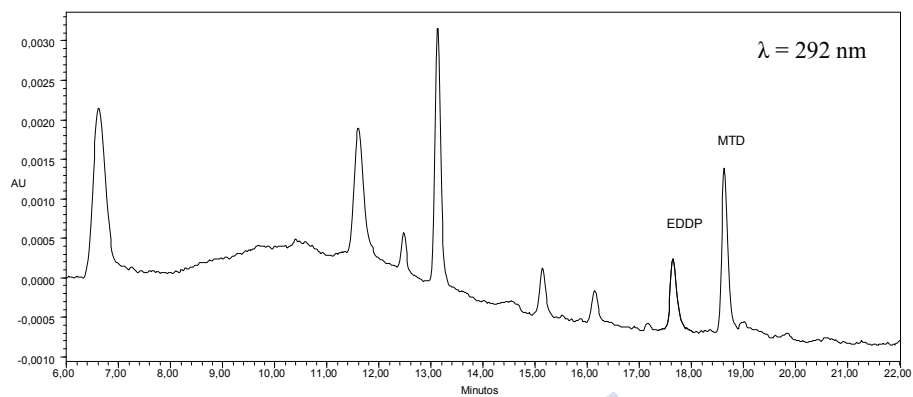


Figura 4.6. Cromatograma de EDDP y Metadona en fase móvil

4.2. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN PLASMA

A pesar de la irrupción de nuevas sustancias psicoactivas en el mercado, los opiáceos y la cocaína siguen siendo ampliamente utilizados con fines recreativos y como drogas de abuso. Esto plantea un grave problema social derivado de la gran cantidad de casos de envenenamiento, agudos y crónicos, que surgen cada año. Se ha observado un aumento del número de primeros ingresos para recibir tratamiento especializado relacionado con la cocaína y las muertes por sobredosis en las que están implicados los opiáceos siguen siendo altas en Europa. (**Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2017; Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2018**).

Las drogas se determinan frecuentemente en el plasma porque se obtiene una buena correlación entre las dosis consumidas y los niveles detectados. Una amplia gama de métodos analíticos para la cuantificación de drogas de abuso en plasma usando cromatografía de gases (**Álvarez y col, 2007; Bravo y col, 2011; Lerch y col, 2014**) o cromatografía líquida de alta resolución (**Stoll y col, 2006; Dowling y Regan, 2011; Ramírez-Fernández y col, 2013; Fernández y col, 2015**) han sido publicados en los últimos años.

La heroína se hidroliza rápidamente a 6-acetilmorfina (6AM), que a su vez se hidroliza a morfina (**Sawynok, 1986**). Por lo tanto, el consumo de heroína puede ser confirmado analíticamente mediante la identificación de los dos metabolitos mencionados (**Crump y col, 1994; Bourquin y col, 1999**).

En presencia de alcohol, la cocaína se convierte en cocaetileno, un compuesto con actividad neurológica y cardíaca, responsable de una elevada sensación de euforia (**Jatlow y col, 1991**). En ausencia de alcohol, la cocaína se hidroliza a sus dos metabolitos principales, benzoilecgonina (BEG) y ecgonina metil éster (EME) (**Sukbuntherng y col, 1995**).

La metadona se utiliza en el tratamiento de heroinómanos a causa de su liberación lenta y la capacidad de suprimir los síntomas de abstinencia (**Sees y col, 2000**). Por tanto, existe una necesidad de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación simultáneas de estas drogas en muestras de drogodependientes a tratamiento con metadona.

En este trabajo, se desarrolló un nuevo método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de array de diodos (HPLC-PDA) para la determinación de morfina, codeína, 6AM, cocaína, BEG, cocaetileno, metadona

y EDDP en plasma, utilizando extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos Bond Elut Certify para extraer las drogas a partir del fluido biológico.

4.2.1. Optimización de la Extracción en fase sólida (SPE)

Inicialmente, se probaron distintos cartuchos de extracción, con rellenos a base de un copolímero hidrofílico-lipofílico (Oasis HLB) o de sílice C18 (Bond Elut Certify). Estos ensayos preliminares fueron realizados en 10 muestras de plasma libre de drogas. Se observó que los cartuchos Bond Elut Certify son los que proporcionan los mejores resultados de selectividad porque se comprueba la ausencia de compuestos endógenos interferentes a los tiempos de retención de las sustancias en estudio, tal y como se demuestra en la **Figura 4.7**. La aplicación del protocolo descrito en la **Tabla 3.5** de *Metodología* confirma la obtención de extractos más limpios usando los cartuchos Bond Elut Certify, en términos de reproducibilidad y reducción en el consumo de muestra y disolventes (**Fernández y col, 1996**).

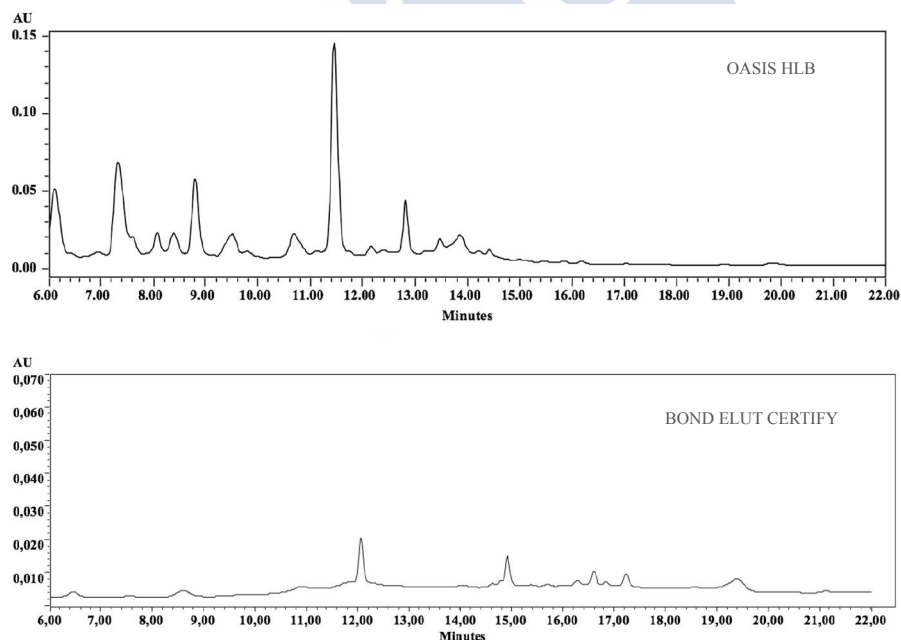


Figura 4.7. Cromatogramas de dos muestras de plasma blanco extraídos con cartuchos Oasis HLB y Bond Elut Certify (HPLC-PDA)

4.2.2. Validación del Método Analítico

4.2.2.1. Linealidad del método

Se prepararon disoluciones-mezcla en plasma, adicionando las drogas de abuso en cantidad adecuada para obtener las *concentraciones iniciales*: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 y 10 µg/mL para cada una de las drogas en estudio. A continuación, se procede a la extracción en fase sólida con cartuchos Bond Elut Certify y se aplica el método cromatográfico con el fin de construir las rectas de calibrado de las ocho drogas en plasma, realizando tres replicados de cada nivel. Se parte de 1000 µL de plasma y se reconstituye el extracto seco en 100 µL de fase móvil, obteniendo así unas *concentraciones postextracción* 10 veces mayores que las iniciales: 1; 2; 5; 10; 20; 50 y 100 µg/mL.

Las ecuaciones fueron del tipo $Y = AX + B$, donde Y es el área bajo la curva del pico para cada droga y X es la concentración plasmática postextracción. En el cálculo de la concentración de una muestra real, procedente de un sujeto intoxicado, se ha de tener en cuenta el volumen inicial y el volumen final:

$$\text{Conc. en muestra real} = \text{Conc. en recta de calibrado} \times \text{volumen final} / \text{volumen inicial}$$

Así pues, si se mantiene el volumen inicial y se reconstituye el extracto seco en un volumen final menor, que, como mínimo, puede ser de 50 µL, las disoluciones post-extracción serían 20 veces más concentradas que el plasma de partida, pudiendo así cuantificarse concentraciones plasmáticas tan bajas como 50 ng/mL.

En base a los criterios de **Bressolle y col (1996)** para la validación de métodos cromatográficos, se observa una buena linealidad porque las pendientes de las rectas de calibrado son todas estadísticamente diferentes de cero y los coeficientes de correlación no son estadísticamente diferentes de uno. Las **Tablas 4.1 y 4.2** muestran los resultados del análisis de regresión y del análisis de la varianza (ANOVA) utilizado para la validación de las rectas de calibrado en plasma, previa extracción en fase sólida (SPE) de las drogas de abuso. Se pone de manifiesto una buena linealidad en todos los casos, a la vista de los coeficientes de correlación obtenidos.

Tabla 4.1. Análisis de regresión para las drogas en plasma

Morfina			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	7,78E+002	29,31	26,55
Ordenada en el origen	-8,88E+002	0,66E+003	1,35
Codeína			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	1,77E+003	57,16	31,01
Ordenada en origen	-1,06E003,	1,28E+003	0,83
6AM			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	1,21E+003	11,05	109,79
Ordenada en origen	-3,90E+001	0,25E+003	0,16
BEG			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	6,61E+003	265,75	24,86
Ordenada en origen	-4,52E+003	5,97E+003	0,76
Cocaína			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	1,09E+004	701,08	15,53
Ordenada en origen	1,90E+004	1,57E+003	1,21
Cocaetileno			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	1,41E+004	178,31	79,33
Ordenada en origen	-4,57E+003	4,01E+003	1,13
EDDP			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	8,77E+001	1,52	57,81
Ordenada en origen	1,07E+002	0,34E+003	3,12
Metadona			
Coeficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	5,12E+002	27,93	18,32
Ordenada en origen	-6,49E+002	0,63E+003	1,03

Tabla 4.2. Análisis de la varianza (ANOVA)

DROGA	Coefficiente Correlación	Error Estándar	Coefficiente Determinación R^2 (%)	Test linealidad	Test falta de ajuste
Morfina	0,997	1,22E+003	99,40	0,000	0,249
Codeína	0,998	2,38E+003	99,60	0,000	0,454
6AM	0,999	0,46E+003	99,80	0,000	0,883
BEG	0,992	2,92E+004	98,41	0,000	0,491
Cocaína	0,997	1,11E+004	99,40	0,000	0,295
Cocaetileno	0,999	7,44E+003	99,80	0,000	0,323
EDDP	0,994	1,16E+003	98,80	0,000	0,035
Metadona	0,999	0,63E+002	99,80	0,000	0,359

A la vista de los resultados y de los coeficientes de determinación (R^2) los modelos ajustados explican la variabilidad en un porcentaje próximo al 100%. Los coeficientes de correlación presentan valores entre 0,992 y 0,999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Se validaron los modelos de calibración mediante análisis de la varianza (ANOVA), utilizando un test de linealidad y otro de falta de ajuste para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), mediante el software Statgraphics.

En primer lugar, el test de linealidad plantea las siguientes hipótesis:

$H_0 \rightarrow y$ no está correlacionada con x (no hay linealidad)

$H_1 \rightarrow y$ está correlacionada con x (hay linealidad)

Para este test, el valor de probabilidad (P-valor) es menor que 0,05 con lo que se rechaza la hipótesis nula, afirmando que existe una relación entre las variables: señal cromatográfica (y) y concentración (x), con significación estadística.

El segundo test realizado es el de falta de ajuste, y las hipótesis planteadas son:

$H_0 \rightarrow$ falta de ajuste = error aleatorio

$H_1 \rightarrow$ falta de ajuste \neq error aleatorio

En este caso, el valor de probabilidad (P-valor) es mayor que 0,05 con lo que se acepta H_0 y la falta de ajuste es comparable al error aleatorio, inherente de la experimentación, y los datos se ajustan a una línea recta.

4.2.2.2. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) fue evaluado de acuerdo con **Armbruster y col (1994)**. Se acepta como límite inferior de cuantificación (LLOQ), la concentración más baja de la curva de calibrado de cada droga, que cumple las condiciones de precisión y exactitud requeridas (**Shah y col, 2000; Peters y Maurer, 2002**). Los resultados del LOD son aceptables para los fines propuestos en este trabajo, oscilando entre 10 ng/mL para cocaína, BEG y cocaetileno, y 55 ng/mL para EDDP (**Tabla 4.3**). Estos valores son similares a los obtenidos por **Caufield y Stewart (2002)**, **Dams y col (2002)** y **Brunetto y col (2003)** que usaron la misma técnica cromatográfica que nosotros (HPLC-PDA). Sin embargo, otros autores han conseguido límites de detección menores que los reportados aquí, cuando se utilizó cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas para determinar opiáceos y/o cocaína y sus metabolitos (**Maralikova y Weinmann, 2004; Giroud y col, 2004; Johansen y Bhatia, 2007; Bravo y col, 2011**).

Tabla 4.3. Límites de detección y cuantificación de las drogas en plasma

DROGA	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
Morfina	24	100
Codeína	32	100
6AM	30	100
BEG	10	100
Cocaína	10	100
Cocaetileno	10	100
EDDP	55	100
Metadona	49	100

La concentración inferior del rango de calibración cumple las condiciones mencionadas anteriormente respecto a la precisión y la exactitud para que pueda considerarse como el límite inferior de cuantificación. Para todos los analitos el LLOQ (Low Limit of Quantification) en plasma es 100 ng/mL.

4.2.2.3. Precisión y exactitud

Se realizaron estudios intra-día e inter-día, a dos niveles de concentración (2 y 10 µg/mL) y cinco replicados en cada caso. Las concentraciones se obtuvieron sobre una recta de calibrado preparada en el mismo día (ensayos intra-día) o en cinco días diferentes (ensayos inter-día), y los resultados se reflejan en las **Tablas 4.4 y 4.5** y en la **Figura 4.8**.

Tabla 4.4. Precisión y exactitud intra-día de las drogas en plasma

DROGA	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración media medida (µg/mL) (n = 5)	Precisión (%CV) (n = 5)	Exactitud (%error relativo) (n = 5)
Morfina	2	1,8	4,4	5,9
	10	9,0	3,6	4,9
Codeína	2	2,0	4,3	8,2
	10	9,9	2,1	5,3
6AM	2	1,9	7,2	5,6
	10	8,7	5,7	4,3
BEG	2	1,7	6,0	5,7
	10	8,9	1,5	0,4
Cocaína	2	1,7	3,9	8,7
	10	9,2	1,2	7,5
Cocaetileno	2	1,9	4,0	6,9
	10	9,4	1,8	4,9
EDDP	2	1,8	3,9	6,1
	10	9,1	1,7	0,5
Metadona	2	1,9	6,2	8,0
	10	10,0	2,9	3,7

Tabla 4.5. Precisión y exactitud inter-día de las drogas en plasma

DROGA	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración media medida (µg/mL) (n = 5)	Precisión (%CV) (n= 5)	Exactitud (%error relativo) (n=5)
Morfina	2	1,9	6,0	11,8
	10	9,1	4,9	6,7
Codeína	2	1,9	5,8	8,9
	10	9,4	3,4	4,6
6AM	2	2,0	8,2	11,7
	10	8,5	6,2	5,9
BEG	2	1,7	7,1	8,8
	10	8,2	3,9	3,1
Cocaína	2	1,6	5,3	6,4
	10	9,2	3,4	4,1
Cocaetileno	2	1,9	6,1	7,3
	10	9,6	3,0	4,1
EDDP	2	1,7	5,7	10,2
	10	9,0	3,1	6,8
Metadona	2	1,9	8,9	11,0
	10	9,8	4,2	7,0

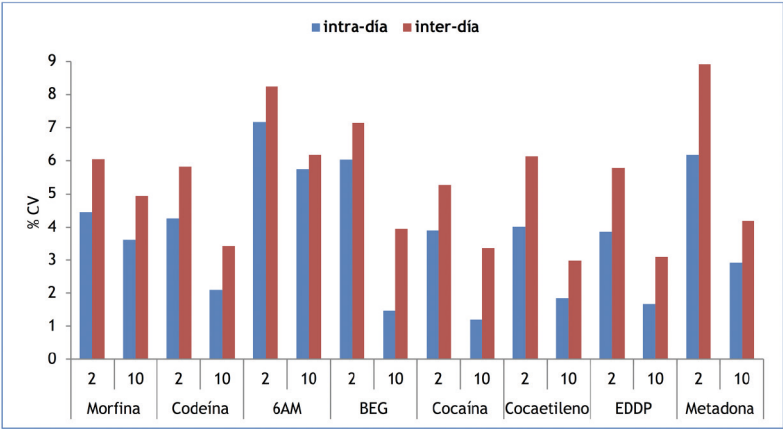


Figura 4.8. Estudio comparativo de la precisión intra-día e inter-día para las drogas de abuso en plasma (2 y 10 µg/mL).

Los coeficientes de variación fueron aceptables para las ocho drogas (**FDA, 2001**). En los ensayos intra-día se obtuvieron valores comprendidos entre 1,7 y 7,2% para los opiáceos y entre 1,2 y 6,0% para la cocaína y sus metabolitos; en los ensayos inter-día se obtuvieron coeficientes de variación entre 3,1 y 8,9% para los opiáceos y entre 3,0 y 7,1% para la cocaína y sus metabolitos. Estos valores son menores que los obtenidos por **Bjork y col (2013)** y **Bassan y col (2011)** para opiáceos y cocaína, cuantificados por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas. Por otra parte, otros autores obtienen valores de precisión similares a los obtenidos en este trabajo (**Abhukalaf y col, 2001**; **Rofael y Abdel-Rahman, 2002**; **Dowling y Regan, 2011**; **Sørensen y Hasselstrøm, 2013**).

La exactitud o error relativo fue calculada para opiáceos y metabolitos (morfina, codeína, 6AM, metadona y EDDP) y para cocaína y dos de sus metabolitos (benzoilecgonina y cocaetileno). Los resultados fueron aceptables según criterios establecidos por la **FDA (2001)**, y oscilaron entre 0,4% (benzoilecgonina) y 8,7% (cocaína) para los ensayos intra-día, y entre 3,2% (benzoilecgonina) y 11,8% (morfina) para los ensayos inter-día. **Rook y col (2005)** y **Ramírez Fernández y col (2013)** encontraron valores inferiores a los nuestros para la morfina y 6AM, pero otros autores publicaron errores relativos superiores a los nuestros para la me-tadona (**Ebrahimzadeh y col, 2010**) y para la cocaína (**Giroud y col, 2004**).

4.2.2.4. Recuperación

Se calcula comparando el área media bajo el pico obtenida de cinco replicados de un patrón en fase móvil con el área media bajo el pico, obtenida de cinco replicados de una disolución de igual concentración en plasma y que han sido sometidos a la extracción en fase sólida con cartuchos Bond Elut Certify (**Shah y col, 2000**; **Peters y Maurer, 2002**). Se ha introducido un factor de corrección en este cálculo para tener en cuenta que, aunque el

volumen utilizado de eluyente fue 3 mL, se han recuperado siempre 2,5 mL.

$$\% \text{ recuperación} = (\text{área media plasma} / \text{área media fase móvil}) \times (2,5/3) \times 100$$

La **Tabla 4.6** y la **Figura 4.9** recogen las recuperaciones obtenidas para las concentraciones de 2 y 10 µg/mL de cada droga en plasma. Las recuperaciones medias para los opiáceos oscilaron entre 67,7% (6-acetilmorfina) y 95,0% (metadona), mientras que los rendimientos medios para la cocaína y sus metabolitos variaron desde 60,0% (benzoilecgonina) a 89,4% (cocaetileno).

Tabla 4.6. Recuperación de las drogas en plasma

DROGA	Concentración añadida (µg/mL)	Área media (fase móvil) (n = 5)	Área media (plasma) (n = 5)	Recuperación (%) (n = 5)	Recuperación media (%) (n = 5)
Morfina	2	729	668	76,1	83,2±4,0
	10	6330	6892	90,4	
Codeína	2	2350	2480	87,6	94,1±4,7
	10	13734	16640	100,6	
6AM	2	3023	2381	65,4	67,7±3,3
	10	14278	12061	70,1	
BEG	2	10160	7700	62,9	60,0±3,2
	10	89449	61580	57,1	
Cocaína	2	50415	40800	67,2	69,2±3,3
	10	148941	128000	71,3	
Cocaetileno	2	22549	23630	87,1	89,4±4,4
	10	123486	136430	91,7	
EDDP	2	349	282	67,1	71,0±2,9
	10	1091	984	74,8	
Metadona	2	345	375	90,2	95,0±5,1
	10	3721	4471	99,7	

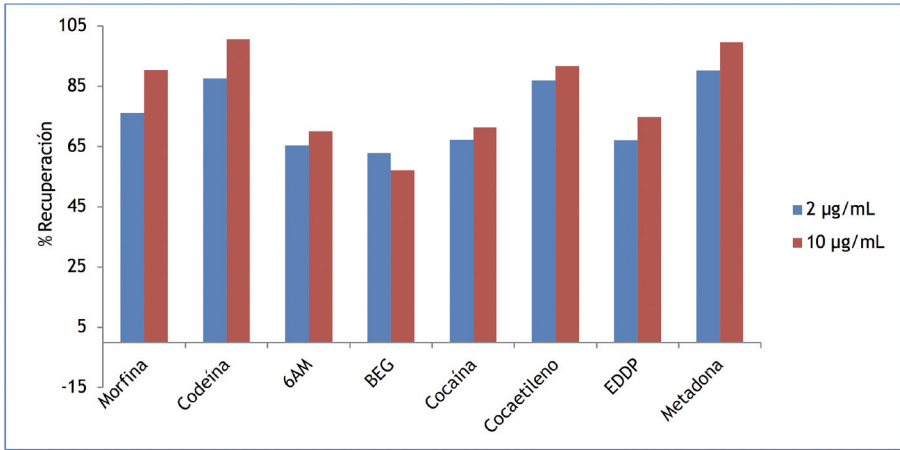


Figura 4.9. Estudio comparativo de la exactitud, en términos de % Recuperación, a dos concentraciones de las drogas de abuso en plasma

Las recuperaciones de la cocaína y la benzoilecgonina son menores que las reportadas por **Brunetto y col (2003)** y **Dowling y Regan (2011)**, y son similares a las que han sido publicadas por **Johansen y Bathia (2007)** y **Napoletano y col (2012)** para la cocaína. Por el contrario, las recuperaciones relativas a la morfina y/o metadona son más elevadas que las obtenidas por otros autores en plasma, suero o sangre total (**Bourquin y col, 1999; Dams y col, 2002; Rook y col, 2005; Musshoff y col, 2006**). Recientemente, **Bjork y col (2010 y 2013)** obtuvieron recuperaciones de 34% y 70% para morfina, 79% para codeína, y 69% y 91% para metadona en plasma, todos inferiores a los valores medios de estas tres drogas, mostrados en la tabla anterior.

4.2.2.5. Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas

Este método fue aplicado a 21 muestras de plasma procedentes de sobredosis fatales con metadona, heroína y/o cocaína (**Tabla 4.7 y Figura 4.10**). La presencia o ausencia de drogas en cada caso confirma los resultados obtenidos por aplicación previa de EMIT. Los pacientes son 16 hombres y 5 mujeres en los que se detectaron opiáceos y/o cocaína, junto con otras sustancias como

cafeína, benzodiacepinas, alcohol, cannabis, paracetamol y/o propoxifeno. Se aprecia consumo de heroína en 17 casos, consumo de metadona en 11 casos y consumo de cocaína en todos los sujetos estudiados. Los niveles de morfina son mayores que los de 6AM, excepto en dos muertes rápidas en las que no ha pasado el tiempo suficiente para que la 6-acetilmorfina se hidrolice a morfina (casos 2 y 14). Los niveles plasmáticos de la BEG resultaron ser siempre superiores a los de cocaína y cocaetileno, lo que justifica la mayor importancia cuantitativa de la benzoilecgonina frente a otros metabolitos. Diez de los once sujetos que consumieron metadona, presentan mayores concentraciones de la misma, frente a su meta-bolito EDDP. Las relaciones de las concentraciones medias de las drogas y sus metabolitos son:

$$\begin{aligned} \text{MRF/COD} &= 1,8; \text{MRF/6AM} = 1,6; \\ \text{BEG/COC} &= 2,4; \text{BEG/CET} = 2,8; \text{MTD/EDDP} = 2,5. \end{aligned}$$

Tabla 4.7. Niveles plasmáticos ($\mu\text{g/mL}$) en 21 muertes relacionadas con heroína, cocaína y/o metadona

CASOS	MRF	COD	6AM	BEG	COC	CET	EDDP	MTD	Otras drogas*
1	4,5	-	-	4,0	-	1,7	-	-	Cafeína, Alc, BZD
2	5,2	2,9	8,2	-	-	1,7	0,2	0,6	Cafeína, Alc, BZD
3	2,3	-	-	7,9	1,4	2,0	-	0,3	Cafeína, Alc, BZD
4	-	-	-	3,9	1,7	-	0,2	0,5	Cafeína, BZD, THC, Paracet
5	3,5	1,9	1,2	1,2	-	-	0,4	0,7	Cafeína
6	2,0	1,1	0,6	1,2	-	1,0	-	0,2	Cafeína, Alc, THC
7	4,2	2,2	1,3	1,6	-	-	-	-	Cafeína, THC

8	-	-	-	1,4	-	0,7	0,2	0,2	Cafeína, Alc, BZD, THC
9	-	-	-	1,7	1,0	-	-	0,1	Cafeína, THC
10	3,5	1,8	1,3	7,7	1,5	-	-	-	Cafeína, BZD
11	1,9	1,0	0,8	3,0	1,1	-	-	-	Cafeína
12	1,7	1,0	0,7	1,7	0,5	0,7	-	-	Cafeína, Alc, THC, BZD
13	-	2,7	-	9,6	-	1,7	-	-	Cafeína, Alc, BZD, THC, Propoxifeno
14	-	-	1,2	1,2	-	-	-	-	Cafeína, BZD, THC
15	3,3	2,1	-	2,5	-	1,3	-	0,4	Alc
16	-	2,1	-	2,2	-	1,2	-	0,2	Cafeína, Alc, BZD
17	-	2,2	-	6,5	1,9	-	0,2	2,2	Cafeína, BZD, THC
18	2,3	-	-	6,7	2,9	1,8	-	-	Cafeína, Alc, BZD, THC
19	-	-	-	-	-	1,7	0,1	0,4	Cafeína, Alc, BZD
20	2,2	1,1	-	1,8	-	1,0	-	-	Cafeína, Alc
21	2,0	1,3	-	1,8	-	0,6	-	-	THC, Alc
Frecuencia	13/21	13/21	8/21	19/21	8/21	13/21	6/21	11/21	
Concent. Media	3,0	1,8	1,9	3,6	1,5	1,3	0,2	0,5	
Rango	1,7-5,2	1,0-2,9	0,6-8,2	1,2-9,6	0,5-2,9	0,6-2,0	0,1-0,4	0,1-2,2	

BZD: Benzodiacepinas; Alc. Alcohol; THC: Cannabis

■ Morfina ■ Codeína ■ 6AM ■ BEG ■ Cocaína ■ Cocaetileno ■ EDDP ■ Metadona

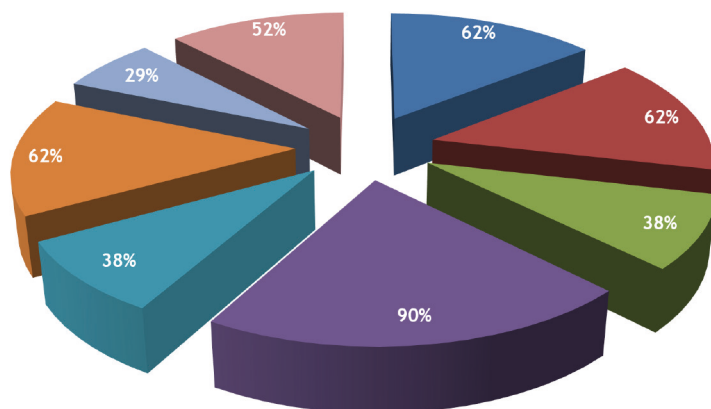


Figura 4.10. Distribución de las drogas encontradas en 21 muestras de plasma de sujetos consumidores de drogas de abuso

La **Tabla 4.8** incluye los resultados obtenidos por otros autores en 32 publicaciones sobre *intoxicaciones letales y no letales por drogas de abuso*, distribuidas según el agente responsable: solo heroína (5 estudios), heroína+metadona (2 estudios), heroína+cocaína (2 estudios), solo cocaína (12 estudios), solo metadona (6 estudios) y heroína+cocaína+metadona (5 estudios).

Con respecto a las *intoxicaciones por heroína*, la mayoría de los trabajos revisados reportan concentraciones sanguíneas menores que las obtenidas en nuestro estudio para morfina, codeína y 6 acetilmorfina (**Darke y Ross, 2000; Fugelstad y col, 2003; Fernández y col, 2007; Bjork y col, 2010; Minett y col, 2010; Fernández y col, 2015**).

Por el contrario, algunas *sobredosis por cocaína* (sola o con otras drogas) recogidas en la **Tabla 4.8** publican concentraciones sanguíneas mayores que las nuestras, para BEG y/o cocaína (**Fineschi y col, 2002; Giroud y col, 2004; Duer y col, 2006; Molina y col, 2011; Jones y col, 2014**). En seis estudios sobre intoxicaciones cocaínicas mortales, se confirman nuestros resultados en los que se pone de manifiesto siempre un predominio de la benzoilecgonina sobre la cocaína; así, los cocientes de concentraciones sanguíneas BEG/COCA resultaron ser: 5,9

(Brunetto y col, 2003); 8,4 (Duer y col, 2006); 14,9 (Concheiro y col, 2006); 4,5 (Molina y col, 2011); 8,4 (Pilgrim y col, 2013); y 2,4 (Jones, 2014).

Para la *metadona*, los resultados mostrados en nuestra serie son similares a los publicados por Milroy y Forrest (2000), Wolf y col (2004), Shields y col (2007), Baker y col (2008), Eiden y col (2012), y Fernández y col (2015, 2017). Sin embargo, la tabla 4.8 muestra concentraciones mucho más bajas (Musshoff, 2006) o más altas (Laberke, 2010).

Tabla 4.8. Revisión bibliográfica: niveles plasmáticos ($\mu\text{g/mL}$) en intoxicaciones por drogas

Autores, Año	Morfina	Codeína	6AM	BEG	Cocaína	CET	EDDP	Meta- dona
Darke, 2000 10 muertes	0,31 (0,06-0,99)							
Blaho, 2000 111 casos				1,28 \pm 1,29	0,26 \pm 0,5	0,02 \pm 0,06		
Milroy, 2000 111 muertes								0,58 (0,05- 2,7)
Fineschi, 2002 1 muerte (body-stuffer)				86,1	98,1			
Brunetto, 2003 10 muertes				1,58 (0,14- 3,96)	0,27 (0-1,15)			
Fugelstad, 2003 192 muertes	0,2 (0,05-1,2)		0,01 (0,001- 0,08)					
Gagajewski, 2003 96 muertes								0,76 (0,14- 3,99)
Bachs, 2003 43 casos		0,18 (0,048- 0,28)						
Wolf, 2004 139 muertes								0,43 (0,05- 2,7)

Giroud, 2004 1 muerte				10,4	5,0			
Gasche, 2004 1 caso		0,114						
Concheiro, 2006 11 muertes				0,61 (11+) 0,013-1,6	0,041 (4+) 0,008- 0,11			
Musshoff, 2006 1 caso	0,011							0,0023
Duer, 2006 36 muertes				5,9 (0-15,26)	0,7 (0-4,71)			
Johansen, 2007 100 casos				0,87 (100+) 0,009-24	1,20 (44+) 0,010-50			
Shields, 2007 176 muertes								0,54 (0-4)
Fernández, 2007 18 muertes	0,75 (10+) 0,09-1,59	0,99 (3+) 0,11- 1,52	0,72 (9+) 0,06-1,41	1,21 (15+) 0,12-2,08	1,03 (11+) 0,15-1,92	1,06 (7+) 0,25- 2,08	0,73 (6+) 0,13- 1,50	0,91 (8+) 0,16- 1,65
Jones, 2008 795 casos				0,19 (574+) 0,86 (221+)	<LOQ 0,076 (221+)			
Baker, 2008 51 muertes								0,67
Ferreirós, 2008 1 intox. letal* 1 intox. no letal**	0,14* 0,026**	0,44* 0,174**						
Bjork, 2010 267 casos	0,039 (24+)	0,004 (23+)	0,0065 (2+)	0,37 (65+)	0,096 (35+)			0,22 (29+)
Laberke, 2010 37 casos+ (opíáceos) 55 casos+ (coca)	0,52 (0,005-5,0)	0,062 (0,003- 0,7)	0,017 (0,005- 0,04)	0,050 (0,006- 0,15)	0,045 (0,005- 0,19)			1,073 (0,5-2,5)

Minett, 2010 30 casos+ (opiáceos) 16 casos+ (metadona)	0,21 (0,02-1,07)						0,051	0,24
Molina, 2011 461 muertes	Opiáceos (135+)			4,0 (172+) 0,02-90	0,89 (172+) 0,01-78			
Eiden, 2012 64 muertes								0,01-2,8
Napoletano, 2012 1 caso				0,004				
Pilgrim, 2013 49 muertes				2,1 (0,05-33)	0,25 (0,01-3,0)	0,05 (0-0,14)		
Jones, 2014 25 muertes				2,96 (0-22)	1,25 (0-8,5)			
Fernández, 2015 22 casos	0,18 (0-0,28)			0,57 (0-2,96)	0,24 (0-0,43)			0,62 (0-2,04)
Dulaurent, 2016 48 casos (opiáceos) 14 casos (cocaína)	Conc. media: 0,016			Conc. media: 0,38		Conc. media: 0,006		
Sánchez- González, 2016 6 casos				0,50 (0,032-1,52)	0,041 (0-0,17)	0,005 (0-0,007)		
Fernández, 2017 24 casos	1,4 (0-7,988)		2,45 (0-4,7)	1,17 (0-4,2)	0,13 (0-0,3)			0,44 (0-1,3)
Este trabajo 21 casos	3,0 (1,7-5,2)	1,8 (1-2,9)	1,9 (0,6-8,2)	3,6 (1,2-9,6)	1,5 (0,5-2,9)	1,3 (0,6-2)	0,2 (0,1-0,4)	0,5 (0,1-2,2)

Finalmente, es importante destacar que existe una gran variabilidad en las concentraciones sanguíneas postmortem de las drogas estudiadas (**Tablas 4.7 y 4.8**), como consecuencia de la presencia de otras sustancias, diversas patologías de base y/o diferentes grados de tolerancia.

A la vista de los parámetros comentados en este apartado, se puede concluir que la cromatografía de líquidos con detector de red de diodos permite obtener unos buenos resultados en relación con la validación del método, además de presentar ventajas sobre la cromatografía de gases, pues la primera no requiere una derivatización previa de los analitos y es aplicable a sustancias volátiles y no volátiles.

Además, el método SPE-HPLC/PDA propuesto en esta tesis doctoral es sencillo y altamente útil para detectar sobredosis causadas por metadona, heroína y/o cocaína, así como para confirmar si el drogadicto incluido en un programa de deshabituación con metadona está cumpliéndolo estrictamente, asegurando así la abstinencia a las drogas estudiadas.

4.2.3. Referencias

Abhukalaf IK, Parks BA, Silvestrov NA, Von Deutsch DA, Mozayani A, Aboul-Enein HY. *Validation of a solid phase extraction procedure for the GC-MS identification and quantitation of cocaine and three metabolites in blood, urine and milk*. J Liq Chrom & Rel Technol 24: 401-414 (2001).

Achilli G, Cellerino GP, Melzi d'Eril GV, Tagliaro F. *Determination of illicit drugs and related substances by high-performance liquid chromatography with an electrochemical coulometric-array detector*. J Chromatogr A 729: 273-277 (1996).

Álvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, López P. *Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B 845: 90-94 (2007).

Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. *Limits of detection (LOD) / limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical of the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs*. Clin Chem 40: 1233-1238 (1994).

Bachs L, Skurtveit S, Morland J. *Codeine and clinical impairment in samples in which morphine is not detected*. Eur J Clin Pharm 58: 785-789 (2003).

Baker DD, Jenkins AJ. *A comparison of methadone, oxycodone and hydrocodone related deaths in Northeast Ohio*. J Anal Toxicol 32: 165-171 (2008).

Bassan DM, Erdmann, Krüll R. *Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem 400: 43-50 (2011).

Bertol E, Trignano C, Di Milia MG, Di Padua M, Mari F. *Cocaine-related deaths: An enigma still under investigation*. Forensic Sci Int 176: 121-123 (2008).

Bjork MK, Nielsen MKK, Markussen LØ, Klinker HB, Linnet K. *Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 396: 2393-2401 (2010).

Bjork MK, Simonsen KW, Andersen DW, Daslsgaard PW, Siguroardóttir SR, Linnet K, Rasmussen BS. *Quantification of 3 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem 405: 2607-2617 (2013).

Blaho K, Logan B, Winber S, Park L, Schwilke E. *Blood cocaine and metabolite concentrations, clinical findings, and outcome of patients presenting to an Emergency Department (ED)*. Am J Emerg Med 18: 593-597 (2000).

Borriello R, Carfora A, Cassandro P, Petrella R. *A five years study on drug-related deaths in Campania (Italy)*. Ann Ist Super Sanità 50: 328-332 (2014).

Bourquin D, Bundeli P, Lehmann T, Brenneisen R. *Diacetylmorphine and its metabolites in plasma by HPLC with diode-array and atmospheric pressure ionization mass spectrometric detection*. J Liq Chrom Rel Technol 22: 2663-2674 (1999).

Brandsteterová E, Blahová E, Netriová J. *Simple generic SPE assay for HPLC analysis of morphine and its glucuronides in serum samples*. J Liq Chrom Rel Technol 25: 2521-2534 (2002).

Bravo F, González D, Benites J. *Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of opioid drugs in human whole blood and plasma*. J Chil Chem Soc 56: 799-802 (2011).

Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. *Validation of liquid chromatographic method. Applications to pharmacokinetics*. J Chromatogr 686: 3-10 (1996).

Brunetto R, Gutiérrez L, Delgado Y, Galignani M, Burguera JL, Burguera M. *High-performance liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human blood plasma sample into an alkyl-diol-silica (ADS) precolumn*. Anal Bioanal Chem 375: 534-538 (2003).

Caufield WV, Stewart JT. *Rapid determination of selected drugs of abuse in human plasma using a monolithic silica HPLC column and solid phase extraction*. J Liq Chrom Rel Technol 25: 2977-2998 (2002).

Concheiro M, de Castro A, Quintela O, López-Rivadulla M, Cruz A. *Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. An application to 156 road fatalities*. J Chromatogr B 832: 81-89 (2006).

Crump KL, McIntyre IM, Drummer OH. *Simultaneous determination of morphine and codeine in blood and bile using dual ultraviolet and fluorescence high-performance liquid chromatography*. J Anal Toxicol 18: 208-212 (1994).

Dams R, Benijts T, Lambert WE, De Leenheer AP. *Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography-diode-array detection-fluorescence detection after solid-phase extraction*. J Chromatogr B 773: 53-61 (2002).

Darke S, Ross J. *Fatal heroin overdoses resulting from non-injecting routes of administration, NSW, Australia*. Addiction 95: 569-573 (2000).

Dowling G, Regan L. *A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection*. J Pharm Biomed Anal 54: 1136-1145 (2011).

Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. *Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine*. J Forensic Sci 51: 421-425 (2006).

Dulaurent S, El Balkhi S, Poncelet L, Gaulier J-M, Marquet P, Saint-Marcoux F. *QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood*. Anal Bioanal Chem 408: 1467–1474 (2016).

Ebrahimzadeh H, Khezri E, Kamarei F. *Determination of methadone in biological samples using liquid phase microextraction with back extraction combined with LC*. Chromatographia 72: 231-237 (2010).

Eiden C, Cathala P, Mathieu-Daude J-C, Marson B, Baccino E, Leglise Y, Peyrière H. *Methadone-related deaths in Montpellier and region, from 2000 to 2010*. Thérapie 67: 515-522 (2012).

FDA, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for industry, bioanalytical method validation*. (2001). <https://www.fda.gov/media/70858/download>

Fernández P, González M, Regenjo M, Ares AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. *Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A 1485: 8-19 (2017).

Fernández P, Lafuente N, Bermejo AM, López-Rivadulla M, Cruz A. *HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers*. J Anal Toxicol 20: 224-228 (1996).

Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. *Microwave-assisted extraction and HPLC.DAD determination of drugs of abuse in human plasma*. J Anal Toxicol 31: 388-393 (2007).

Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. *Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography*. J Appl Toxicol 35: 418-425 (2015).

Ferreirós N, Dresen S, Hermanns-Clausen M, Auwaerter V, Thierauf A, Müller C, Hentschel R, Trittler R, Skopp G, Weinmann

W. *Fatal and severe codeine intoxication in 3-year-old twins—interpretation of drug and metabolite concentrations.* Int J Legal Med 123: 387–394 (2009).

Fineschi V, Centini F, Monciotti F, Turillazzi E. *The cocaine “body stuffer” syndrome: a fatal case.* Forensic Sci Int 126: 7–10 (2002).

Fugelstad A, Ahlner J, Brandt L, Ceder G, Eksborg S, Rajs J, Beck O. *Use of morphine and 6-monoacetylmorphine in blood for the evaluation of possible risk factors for sudden death in 192 heroin users.* Addiction 98: 463–470 (2003).

Gagajewski A, Apple FS. *Methadone-related deaths in Hennepin County, Minnesota: 1992–2002.* J Forensic Sci 48: 668–671 (2003).

Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. *Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism.* N Engl J Med 351: 2827–2831 (2004).

Giroud C, Michaud K, Sporkert F, Eap C, Augsburger M, Cardini P, Mangin P. *A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by Hydrophilic Interaction Chromatography–Mass Spectrometry (HILIC-MS).* J Anal Toxicol 28: 464–474 (2004).

ICH, International Conference on Harmonization (2005). *Validation of analytical procedures: Methodology ICH Q2B.* <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

Jamdar SC, Pantuck CB, Díaz J, Mets B. *A rapid, sensitive assay for cocaine and its metabolites in biological fluids using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.* J Anal Toxicol 24: 438–441 (2000).

Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry C, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH. *Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion.* Life Sci 48: 1787–1794 (1991).

Johansen SS, Bhatia HM. *Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.* J Chromatogr B 852: 338–344 (2007).

Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC. *Concentration of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden*. Forensic Sci Int 177: 133-139 (2008).

Jones AW, Holmgren A. *Concentrations of cocaine and benzoylecgonine in femoral blood from cocaine-related deaths compared with venous blood from impaired drivers*. J Anal Toxicol 38: 46-51 (2014).

Klingmann A, Skopp G, Aderjan R. *Analysis of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester and ecgonine by high-pressure liquid chromatography-API mass spectrometry and application to a short-term degradation study of cocaine in plasma*. J Anal Toxicol 25: 425-430 (2001).

Laberke PJ, Bartsch C. *Trends in methadone-related deaths in Zurich*. Int J Legal Med 124: 381-385 (2010).

Lerch O, Temme O, Daldrup T. *Comprehensive automation of the solid-phase extraction gas chromatographic mass spectrometric analysis (SPE-GC/MS) of opioids, cocaine and metabolites from serum and other matrices*. Anal Bioanal Chem 406: 4443-4451 (2014).

Logan BK, Stafford DT. *High-Performance Liquid Chromatography with column-switching for the determination of cocaine and benzoylecgonine concentrations in vitreous humor*. J Forensic Sci 35: 1303-1309 (1990).

Maralíková B, Weinmann W. *Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification*. J Chromatogr B 811: 21-30 (2004).

Milroy CM, Forrest AR. *Methadone deaths: a toxicological analysis*. J Clin Pathol 53: 277-281 (2000).

Minett WJ, Moore TL, Juhascik MP, Nields HM, Hull MJ. *Concentrations of opiates and psychotropic agents in polydrug overdoses: A surprising correlation between morphine and antidepressants*. J Forensic Sci 55: 1319-1325 (2010).

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. Pharmaceutical Press, London, 2004.

Molina DK, Hargrove VM. *Fatal cocaine interactions: A review of cocaine-related deaths in Bexar County, Texas*. The Am J Forensic Med Pathol 32: 71-77 (2011).

Musshoff F, Padosch S, Steinborn S, Madea B. *Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs*. Forensic Sci Int 142: 161-210 (2004).

Musshoff F, Trafkowski, Kuepper U Madea B. *An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites*. J Mass Spectrom 41: 633-640 (2006).

Napoletano S, Montesano C, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Roccia C, Sergi M. *Determination of illicit drugs in urine and plasma by micro-SPE followed by HPLC-MS/MS*. Chromatographia 75: 55-63 (2012).

Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). *Informe 2017*. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Centro de Publicaciones, Madrid, 2017.

Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. *Informe Europeo sobre Drogas 2017: tendencias y novedades*. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo, 2017.

Origer A, Lopes da Costa S, Baumann M. *Opiates and cocaine-related fatal overdoses in Luxembourg from 1985 to 2011: A study on gender differences*. Eur Addict Res 20: 87-93 (2014).

Pavarin RM. *Cocaine consumption and death risk: a follow-up study on 347 cocaine addicts in the metropolitan area of Bologna*. Ann Ist Super Sanità 44: 91-98 (2008).

Pereiro C, Bermejo AM, Fernández P, Tabernero MJ. *Deaths from drug abuse in Northwestern Spain, 1992–97*. Addict Biol 8: 89-95 (2003).

Peters FT, Maurer HH. *Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review*. Accred Qual Assur 7: 441-449 (2002).

Pilgrim JL, Woodford N, Drummer OH. *Cocaine in sudden and unexpected death: A review of 49 post-mortem cases*. Forensic Sci Int 227: 52-59 (2013).

Ramirez Fernández MM, Wille SMR, Kummer N, Di Fazio V, Ruysinckx E, Samyn N. *Quantitative analysis of 26 opioids, cocaine and their metabolites in human blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Ther Drug Monit 35: 510-521 (2013).

Rofael HZ, Abdel-Rahman MS. *Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and ketamine*. J Appl Toxicol 22: 123-128 (2002).

Rook EJ, Hillebrand MJX, Rosing H, Van Ree J, Beijnen JH. *The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B 824: 213-221 (2005).

Sánchez-González J, García-Carballal S, Cabarcos P, Tabernero MJ, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. *Determination of cocaine and its metabolites in plasma by porous membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A 1451: 15-22 (2016).

Santos V, Vera López KJ, Moraes Santos L, Yonamine M, Carvalho Carmina MJ, Cavani J Santos SR. *Determining plasma morphine levels using GC-MS after solid phase extraction to monitor drug levels in the postoperative period*. Clinics 63: 307-314 (2008).

Sawynok J. *The therapeutic use of heroin: a review of the pharmacological literature*. Can J Physiol Pharmacol 64: 1-6 (1986).

Sees KL, Delucchi KL, Masson C, Rosen A, Clark H, Robillard H, Banys P, Hall SM. *Methadone maintenance versus 180-day psycho-socially enriched detoxification for treatment of opioid dependence: a randomised controlled trial*. JAMA 283: 1303-1310 (2000).

Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. *Bioanalytical method validation - A revisit with a decade of progress*. Pharm Res 17: 1551-1557 (2000).

Shields LBE, Hunsaker III JC, Corey TS, Ward MK, Stewart D. *Methadone toxicity fatalities: A review of medical examiner cases in a large metropolitan area*. J Forensic Sci 52: 1389-1395 (2007).

Sørensen LK, Hasselstrøm JB. *A high-throughput multi-class liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantitative determination of licit and illicit drugs in whole blood*. Anal Methods 5: 3185-3193 (2013).

Stoll DR, Paek C, Carr PW. *Fast gradient elution reversed-phase HPLC with diode-array detection as a high throughput screening method for drugs of abuse. I: Chromatographic conditions*. J Chromatogr A 1137: 153-162 (2006).

Sukbuntherng J, Walters A, Chow H, Mayersohn M. *Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine) and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatograph*. J Pharm Sci 84: 799-804 (1995).

Theodoridis G, Papadoyannis I, Tsoukali-Papadoulou H, Vasilikiotis G. *A comparative study of different solid phase extraction procedures for the analysis of alkaloids of forensic interest in biological fluids for RP-HPLC/Diode Array*. J Liquid Chromatogr 18: 1973-1995 (1995).

Wolf BC, Lavezzi WA, Sullivan LM, Flannagan LM. *Methadone-related deaths in Palm Beach County*. J Forensic Sci 49: 375-378 (2004).

4.3. ENSAYOS DE DROGAS DE ABUSO EN FLUIDO ORAL

La mayoría de las drogas psicotrópicas se han determinado tradicionalmente en sangre y orina ya que estos compuestos y sus metabolitos se detectan fácilmente en estas matrices biológicas. Sin embargo, en las últimas dos décadas, la saliva o fluido oral ha sido empleada cada vez más para controlar el uso de drogas en el lugar de trabajo, las escuelas y para los propósitos de justicia penal (**Kadehjian, 2005**). El fluido oral tiene importantes ventajas sobre la sangre y orina, incluyendo la facilidad de su recogida y la presencia mayoritaria de las drogas en su forma original. No obstante, este fluido también presenta algunos inconvenientes, tales como una ventana estrecha de detección, concentraciones bajas de las drogas, pH variable y riesgo de contaminación procedente de los residuos de medicamentos presentes en la cavidad oral (**Aps y Martens, 2005**).

El creciente uso simultáneo de varias drogas de abuso ha requerido el desarrollo de métodos convenientes para su detección en pequeñas cantidades de muestra. La preparación correcta de las muestras, incluyendo la limpieza y pre-concentración de las sustancias, es un paso crucial en el análisis de drogas ilegales en fluidos biológicos. Las técnicas de extracción que se utilizan típicamente para este propósito proporcionan resultados aceptables, pero son muy laboriosas. Estas deficiencias se han minimizado mediante el uso alternativo de Toxítubos A, que ha permitido una exitosa extracción de diversos compuestos de forma sencilla y rápida.

Hasta el momento de la realización de este trabajo, los opiáceos y la cocaína habían sido determinados en la saliva usando otros procedimientos de extracción y técnicas analíticas (**Niedbala y col, 2001; Cone y col, 2002; Mortier y col, 2002; De Jager y Andrews, 2002; Jones y col, 2002; Fucci y col, 2003; Clauwaert y col, 2004; Jufer y col, 2006; Cognard y col, 2006**).

En este trabajo, se desarrolla un método para la determinación simultánea de opiáceos, cocaína y metabolitos en saliva utilizando Toxítubos® para la preparación de la muestra, y la cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-PDA) para su posterior análisis. Se usa una columna *XTerra RP8* (250x4,6mm, 5µm) y una fase móvil compuesta por acetonitrilo - tampón fosfato 20mM, pH 6,5 en régimen de gradiente (**Tabla 3.1**), consiguiendo una óptima separación de los siete compuestos estudiados: morfina, 6-acetilmorfina (6AM), cocaína, benzoilecgonina (BEG), cocaetileno (CET), metadona y EDDP en un tiempo razonable.

La identificación de las drogas de abuso se hizo en base a sus espectros de absorción ultravioleta (**Figuras 4.1-4.3**) y a sus tiempos de retención (**Figuras 4.4-4.6**), comprobando la pureza de cada pico, una especificidad satisfactoria y una buena resolución cromatográfica en un tiempo de 20 minutos. De esta forma, se puede seleccionar la longitud de onda a la cual la respuesta cromatográfica es máxima para cada analito, mejorando ostensiblemente la sensibilidad del método.

4.3.1. Optimización de la Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido (LLE), realizada con Toxítubos (**Figura 4.11**), es una técnica sencilla por las siguientes razones:

- Los toxítubos contienen disolventes y sales idealmente proporcionados para el análisis clínico / forense de drogas de abuso.
- Los toxítubos se usan fácilmente: solo se agrega la muestra, se mezcla y se centrifuga.
- Se pueden utilizar con matrices complejas que suponen un desafío: sangre post-mortem, contenido gástrico, tejido hepático, etc.
- No requieren un desarrollo específico del método de extracción.



Figura 4.11: Fotografía de Dispositivos comerciales para extracción líquido-líquido LLE (Toxítubos®)

Estos dispositivos comerciales contienen una disolución tampón de pH 9 y una mezcla de disolventes orgánicos (diclorometano, 1,2-dicloroetano, heptano e isopropanol) para extraer sustancias orgánicas de carácter básico, como las drogas de abuso en estudio (Toxítubos A). Se añade 1 mL de saliva en el

Toxitubo A, y se agita durante 10 minutos para luego centrifugar a 4000 rpm unos 15 minutos. La fase orgánica se evapora a seco en un baño a 40°C, bajo corriente de Nitrógeno, y el extracto se reconstituye en 100 μL de fase móvil. Finalmente, se inyectan 20 μL en el cromatógrafo, para su análisis. Las disoluciones postextracción son 10 veces más concentradas que las iniciales en saliva. La aplicación del protocolo descrito proporciona unos buenos resultados porque se confirma la obtención de extractos limpios en muestras de fluido oral procedentes de sujetos no consumidores de drogas (**Fernández y col, 2008**), así como una buena recuperación para todas las drogas, después de aplicar este procedimiento de extracción.

La **Figura 4.12** recoge un cromatograma tridimensional de una muestra de fluido oral con las drogas, en el que se representan tiempos de retención (min), longitudes de onda (nm) y unidades de absorbancia para todas las sustancias estudiadas.

La **Figura 4.13** muestra dos cromatogramas: el correspondiente a un extracto de una muestra de fluido oral blanco, que demuestra la ausencia de compuestos endógenos a los tiempos de retención de las drogas en estudio y otro referido a una muestra de fluido oral conteniendo las drogas en estudio (concentración = 0,1 $\mu\text{g/mL}$), ambas extraídas con Toxitubos A (LLE) e inyectadas en el cromatógrafo de líquidos (HPLC-PDA).

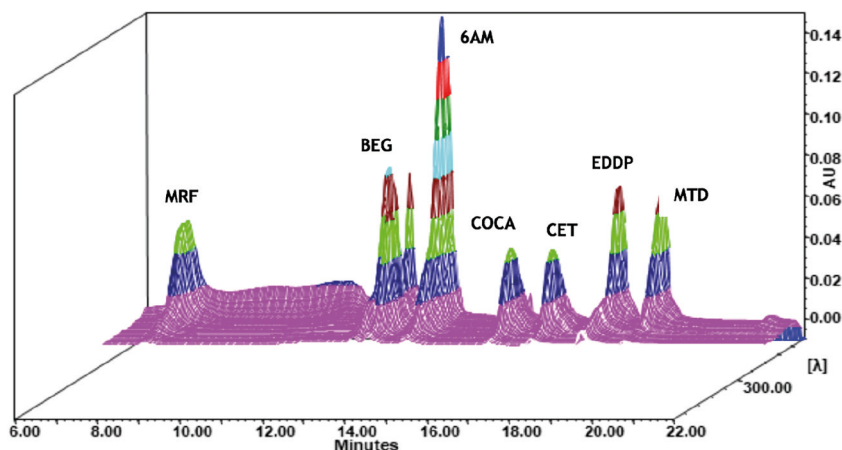


Figura 4.12. Cromatograma tridimensional de las drogas de abuso en fluido oral

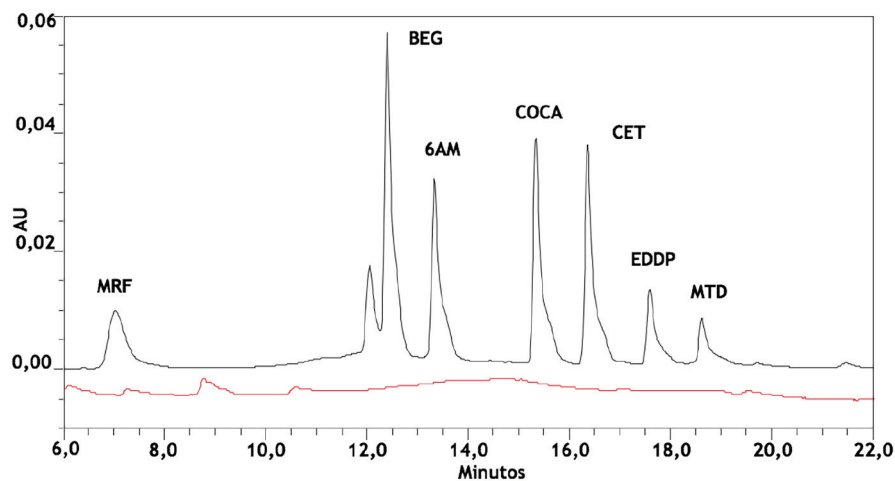


Figura 4.13. Dos cromatogramas monitorizados a 233 nm: fluido oral “blanco” (color rojo) y fluido oral conteniendo las drogas, de concentración 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (color negro)

Los tiempos de retención resultaron ser de 7,0 min para la morfina, 12,4 min para la BEG, 13,3 minutos para la 6AM, 15,3 min para la cocaína, 16,4 min para el cocaetileno, 17,6 min para el EDDP y 18,6 min para la metadona.

4.3.2. Validación del método analítico

4.3.2.1 Linealidad del método

La aplicación del procedimiento de extracción descrito a muestras de saliva libres de drogas confirmaron la ausencia de cualquier compuesto endógeno que pudiera interferir con el análisis cromatográfico de las drogas diana. Asimismo, el método de extracción se aplicó a disoluciones que contenían las siete drogas diana a concentraciones de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/mL}$ en saliva. Los extractos se analizaron en cinco días diferentes, en las condiciones cromatográficas explicadas en el apartado *Metodología*, y los resultados se utilizaron para construir una recta de calibrado para cada analito representando el área bajo el pico cromatográfico frente a las concentraciones post-extracción respectivas ($n=3$). Las **Tablas 4.9 y 4.10** muestran los resultados del

análisis de regresión y del análisis de varianza (ANOVA) utilizado para validar las rectas de calibrado de las drogas de abuso en fluido oral, mediante la extracción con Toxítubos A.

Tabla 4.9. Análisis de regresión para las drogas en fluido oral

Morfina			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	2924,09	30,4705	95,9646
Ordenada en el origen	-451,809	286,447	-1,57729
6AM			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	2805,12	18,2994	153,291
Ordenada en origen	-390,586	172,029	-2,27047
BEG			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	34939,0	102,387	341,243
Ordenada en origen	305,122	962,523	0,317002
Cocaína			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	40195,3	58,283	689,657
Ordenada en origen	278,679	547,907	0,508625
Cocaetileno			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	40044,8	45,2458	885,05
Ordenada en origen	189,448	425,347	0,445397
EDDP			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	389,69	2,22605	175,059
Ordenada en origen	-18,1236	20,9266	-0,866053
Metadona			
Coefficiente	Estimado	Error Estándar	Valor de t
Pendiente	1475,26	19,1048	77,2195
Ordenada en origen	-91,6605	179,6	-0,510358

Tabla 4.10. Análisis de la varianza (ANOVA)

DROGA	Coefficiente Correlación	Error Estándar	R ² (%)	Test linealidad	Test falta de ajuste
Morfina	0,9991	888,164	99,83	0,000	0,122
6AM	0,9996	533,396	99,93	0,000	0,093
BEG	0,9999	2984,42	99,98	0,000	0,527
Cocaína	0,9999	1698,85	99,99	0,000	0,946
Cocaetileno	0,9999	1318,84	99,99	0,000	0,559
EDDP	0,9997	64,8856	99,95	0,000	0,300
Metadona	0,9986	556,873	99,73	0,000	0,774

Según los resultados obtenidos, los coeficientes de determinación (R^2) indican que los modelos ajustados explican la variabilidad en un porcentaje próximo al 100%. Los coeficientes de correlación presentan valores entre 0,9986 y 0,9999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Se realizó la validación de los modelos de calibración mediante análisis de la varianza (ANOVA), utilizando un test de linealidad y otro de falta de ajuste mediante el software Statgraphics, para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$).

El test de linealidad postula las siguientes hipótesis:

$H_0 \rightarrow y$ no está correlacionada con x (no hay linealidad)

$H_1 \rightarrow y$ está correlacionada con x (hay linealidad)

Para este test, el valor de probabilidad (P-valor) es menor que 0,05 con lo que se rechaza la hipótesis nula, afirmando que existe una relación entre las variables señal cromatográfica (y) y concentración (x), con significación estadística.

Las hipótesis planteadas por el test de falta de ajuste son:

$H_0 \rightarrow$ falta de ajuste = error aleatorio

$H_1 \rightarrow$ falta de ajuste \neq error aleatorio

En este caso, el valor de probabilidad (P-valor) es mayor que 0,05 con lo que se acepta H_0 y la falta de ajuste es comparable al error

aleatorio, inherente de la experimentación, y los datos se ajustan a una línea recta.

4.3.2.2 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) se tomó como la concentración más baja causante de un aumento de la señal tan alto como tres veces el ruido de la señal a la longitud de onda seleccionada para cada compuesto. Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) del método propuesto fue tomado como la concentración más baja de la recta de calibrado (50 ng/mL) (**Tabla 4.11** y **Figura 4.14**).

Estas drogas han sido previamente determinadas en saliva utilizando otras técnicas: la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) permitía determinar opiáceos en concentraciones más bajas (**Jones y col, 2002; Cámpora y col, 2006**) y la cocaína en concentraciones mayores (**Fucci y col, 2003**) o similares (**Jenkins y col, 1995; Moolchan y col, 2000**). La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) permitía determinar la cocaína y sus metabolitos con LOD de 0,22 ng/mL (**Mortier y col, 2002**) o 1 ng/mL (**Clauwaert y col, 2004**).

Tabla 4.11. Límites de detección y cuantificación de las drogas en fluido oral

DROGAS	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Morfina	35	50
6AM	25	50
BEG	10	50
Cocaína	10	50
Cocaetileno	10	50
EDDP	35	50
Metadona	25	50

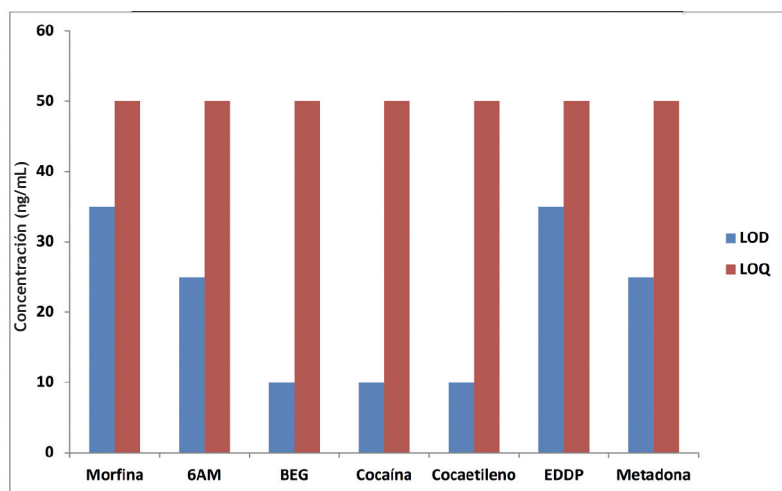


Figura 4.14. Límites de detección y cuantificación de las drogas en fluido oral

4.3.2.3 Precisión, Exactitud y Recuperación

La precisión inter día y la exactitud del método se estimaron mediante el análisis de cinco muestras de saliva que contenían las drogas a dos concentraciones iniciales diferentes (0,1 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$). La precisión se calculó como el coeficiente de variación y la exactitud se expresó como un porcentaje de la diferencia entre la concentración medida y el verdadero valor de la misma concentración. Como puede verse en la **Tabla 4.12** y en las **Figuras 4.15 y 4.16**, los resultados mostraron precisiones menores del 6% y errores relativos menores del 7% en todos los casos. Estos valores son similares o incluso inferiores a los obtenidos por otros autores (**Foulon y col, 1999; Fucci y col, 2003; Cámpora y col, 2003, 2006; Cognard y col, 2006**), usando diferentes procedimientos de extracción y técnicas analíticas.

Las recuperaciones de las drogas se calcularon comparando la respuesta cromatográfica para cada droga, obtenida a partir de cinco muestras de saliva a dos concentraciones (0,1 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$), con la obtenida por inyección directa de fase móvil conteniendo idénticas concentraciones de analito. La recuperación media osciló entre un 60% y un 95% para 6-acetilmorfina y cocaetileno, respectivamente (**Tabla 4.12**).

Tabla 4.12. Precisión, Exactitud y Recuperación de las drogas en fluido oral

	Concent. ($\mu\text{g/mL}$)	Precisión (%CV) Inter-día ($N = 5$)	Exactitud (%error relativo) Inter-día ($N = 5$)	Recuperación media (%)
Morfina	0,1	3,4	1,0	67 ± 1
	1,0	2,5	4,4	
6AM	0,1	3,6	1,2	60 ± 1
	1,0	2,0	1,2	
BEG	0,1	5,6	2,2	69 ± 3
	1,0	3,5	2,9	
Cocaína	0,1	3,7	6,0	86 ± 2
	1,0	2,7	4,1	
Cocaetileno	0,1	4,8	5,4	95 ± 2
	1,0	2,4	6,2	
EDDP	0,1	5,9	4,8	72 ± 2
	1,0	2,4	1,3	
Metadona	0,1	4,8	3,2	77 ± 3
	1,0	3,7	0,7	

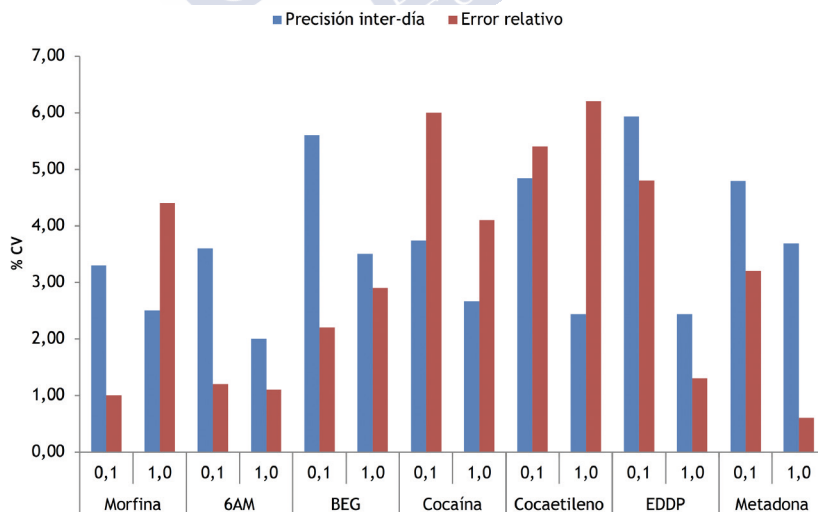


Figura 4.15. Precisión y error relativo de las drogas en fluido oral

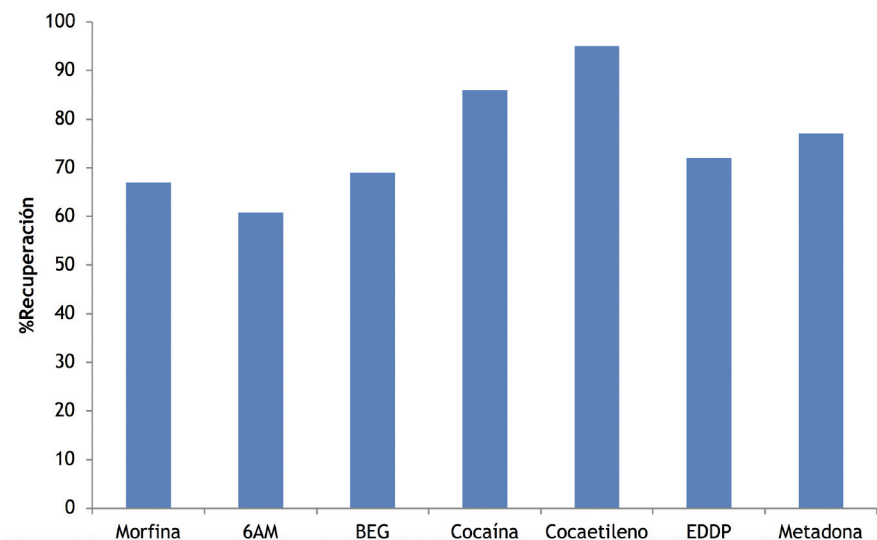


Figura 4.16. Exactitud, en términos de % Recuperación media, para las drogas en fluido oral

Después de realizar una amplia revisión bibliográfica sobre la investigación de drogas de abuso en fluido oral (**Tabla 4.13**), se pone de manifiesto una preferencia de la extracción en fase sólida y la cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas. Los límites de cuantificación publicados por otros autores varían entre 0,06 y 83,7 ng/mL, utilizando detectores de MS-MS y UV respectivamente, frente a los obtenidos por nosotros, en el que se usó un detector de array de diodos (50 ng/mL). La precisión interdía, reportada en 16 de las 20 publicaciones de la tabla 4.12, es igual o inferior al 20%, con valores superiores a los obtenidos en la mayoría de las drogas estudiadas en este trabajo (CV: 2,0-5,6%). A excepción de la 6-acetilmorfina, las recuperaciones medias obtenidas a dos niveles de concentración (0,1 y 1,0 µg/mL) para las drogas de abuso extraídas del fluido oral con Toxitubos A® (extracción líquido-líquido), se encuentran entre el 67% (morfina) y el 95% (cocaetileno). Se trata de valores similares a los hallados por otros investigadores, que usaron la extracción en fase sólida (SPE) o la extracción líquido-líquido (LLE), y otros detectores cromatográficos (UV, MS, MS-MS).

Tabla 4.13. Otros métodos de cromatografía líquida utilizados para determinar opiáceos y/o cocaína en fluido oral

Referencia	Droga	Método	Rango lineal (ng/mL)	LOD / LOQ (ng/mL)	Precisión Inter-día CV (%)	Recup. (%)
Mortier, 2002	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS		0,22-0,29 / 2,0	<16,8	52-99
Dams, 2003	Opiáceos, Cocaína	Pptación prot / MS-MS	0,5-500	0,25-0,5 / 0,5-1,0	4,7-15,3	86-106
Clauwaert, 2004	Cocaína	SPE / MS-MS	10-1000	1 / 10	4-18,1	88±5
Wood, 2005	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	2-200	-- / 2,0	1,8-12,6	92-99
Concheiro, 2007	Opiáceos, Cocaína	LLE / MS	1-250	0,5-1 / 1-2	2,1-14,4	56-87
Øiestad, 2007	Opiáceos, Cocaína	LLE / MS-MS	Opi: 1,6-150 Coca: 7-140	-- / 0,8-7,2	4,9-38,8	34-80
Kala, 2008	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	Opi: 10-500 Coca: 2-1000	/ 2-10	2,8-7,6	Opi: 90 Coca: 85-93
Concheiro, 2008	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	1-200	0,5 / 1,0	1,6-12,3	75-76
Fritch, 2009	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	1,5-12,5	0,4-2,0 / 0,8-4,0	5,2-13,2	98-117
Badawi, 2009	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	0,5-100	-- / 0,5	1,3-16,7	91-119
Wang, 2010	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS		0,04-1,7 / 0,1-1,9	1,4-17,5	87-98
Concheiro, 2010	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	0,5-500	0,2-0,8 / --	<17	92-114
Lund, 2011	Opiáceos, Cocaína	LLE / MS-MS	Opi: 0,1-53 Coca: 0,3-26	-- / 0,06-0,5	5-30	
Cone, 2012	Opiáceos, Cocaína	SPE / MS-MS	Opi: 0,4-1240 Coca: 0,4-1210	-- / 0,4-2,3	4,2-20	104-111
Ranjbari, 2012	Metadona	DLLME / UV	75-5000	25,1 / 83,7	2,2-3,9	99

Di Corcia, 2013	Opiáceos, Cocaína	Pptación prot / MS-MS	Opi: 10-150 Coca: 1-25	0,04 / 3,2	3,8-17,6	83-94
Liu, 2015	Opiáceos	-- / MS-MS	1-100	0,1-0,5 / 0,25-0,5	1,3-12,8	94-111
Valen, 2017	Opiáceos, Cocaína	LLE / MS-MS	0,043-62,3 (4 drogas)	0,02-0,62 / 0,1-1,25	3,4-6,4	70-76
Zeng, 2018	Opiáceos, Cocaína	Dilución / MS-MS	0,5-200	-- / 0,5	0,3-9,5-	72-88
Grabenauer, 2018	Opiáceos	SPE / MS-MS	0,4-350	0,02-0,04 / 0,4-1,5	< 5%	85-100
ESTE TRABAJO	Opiáceos, Cocaína	LLE / PDA	0,05-2,0	10-35 / 50	2,0-5,6	53-95

4.3.2.4 Aplicación a casos reales de intoxicación por drogas

Finalmente se aplicó el procedimiento de extracción líquido-líquido para analizar 29 muestras de saliva procedentes de consumidores de opiáceos y/o cocaína que estaban bajo un programa de desintoxicación (**Tabla 4.14 y Figura 4.17**), obteniéndose resultados positivos en 24 casos. Un total de 22 muestras dieron positivo a la cocaína y/o sus metabolitos, 12 muestras contenían metadona y/o EDDP, y 8 muestras contenían metabolitos de la heroína (morfina y/o 6AM). Estos resultados sólo permiten confirmar la ausencia de consumo reciente, a la hora de la recogida de las muestras, en dos casos positivos a cocaína, doce casos positivos a metadona y dieciseis casos positivos a heroína. Las concentraciones fueron menores que el valor promedio de cada droga en más de la mitad de los casos (55-83%). Según las concentraciones medias obtenidas, la droga original predominó sobre sus metabolitos, coincidiendo con los resultados de otros autores (**Clauwaert y col, 2004; Moffat y col, 2004**). Los niveles de cocaína y metabolitos encontrados en este trabajo son similares a los reportados por **Cognard y col (2006)** y **Foulon y col (1999)**, pero mayores que los obtenidos por **Moolchan y col (2000)**. Estas diferencias pueden atribuirse a factores como la dosis, pH de la saliva y la forma de recogida de las muestras, para la que se usó un dispositivo comercial llamado Salivette® (**Kato y col, 1993**).

Tabla 4.14. Niveles de las drogas ($\mu\text{g/mL}$) encontradas en 29 muestras de fluido oral

Casos	Morfina	6AM	BEG	Cocaína	Cocaetileno	EDDP	Metadona
1	nd	1,07	0,46	nd	nd	1,12	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	0,89	nd	nd	nd
4	1,20	nd	0,41	2,99	nd	nd	0,98
5	nd	nd	0,11	0,47	0,05	nd	nd
6	nd	nd	0,78	1,35	nd	nd	nd
7	3,04	nd	1,03	0,16	nd	nd	0,42
8	nd	nd	0,32	0,29	nd	nd	nd
9	nd	nd	0,58	nd	nd	1,82	2,05
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	nd	nd	0,46	0,05	nd	nd	nd
12	nd	nd	0,05	0,70	nd	0,64	0,51
13	0,49	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	nd	nd	0,36	0,23	nd	nd	0,50
16	1,09	0,18	0,97	2,10	nd	nd	1,96
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	0,97	0,12	0,43	1,33	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd	0,14	0,05	0,77	5,80
20	nd	nd	0,15	0,13	nd	nd	nd
21	nd	nd	0,68	0,47	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
23	2,37	nd	nd	nd	nd	0,75	0,42
24	nd	nd	1,57	nd	nd	nd	nd
25	nd	nd	0,14	0,43	0,05	nd	nd
26	nd	nd	1,09	0,41	0,05	nd	nd
27	2,34	nd	0,11	0,28	0,05	0,74	0,48
28	nd	nd	0,52	0,33	nd	0,20	5,21
29	nd	nd	0,51	0,29	0,06	nd	0,13
Frecuencia (%)	7/29 (24%)	3/29 (10%)	20/29 (69%)	19/29 (66%)	6/29 (21%)	7/29 (24%)	11/29 (38%)
Rango	0,49-3,04	0,12-1,07	0,05-1,57	0,05-2,99	0,05-0,06	0,20-1,82	0,13-5,80

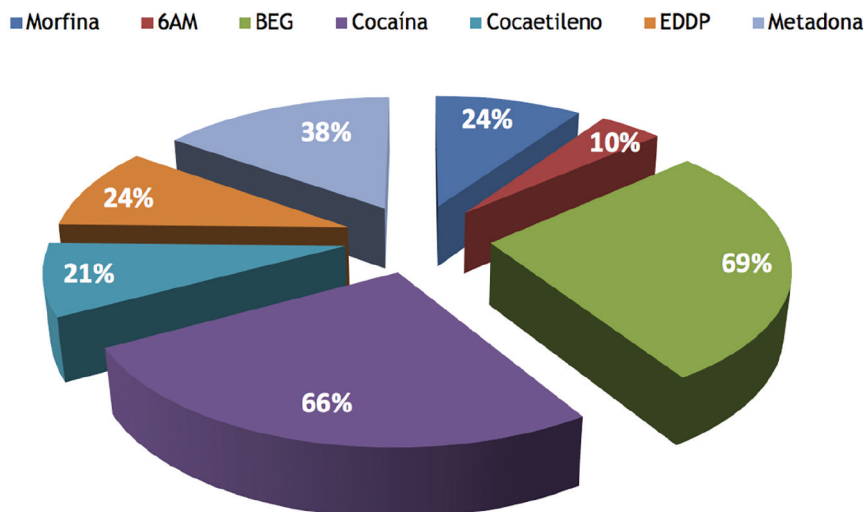


Figura 4.17. Distribución de las drogas encontradas en 29 muestras de fluido oral

La **tabla 4.15** muestra los resultados obtenidos en una revisión bibliográfica acerca de las concentraciones de drogas de abuso en fluido oral de consumidores de opiáceos y/o cocaína. Incluye 21 publicaciones, dos que reportan intoxicaciones solo por opiáceos (morfina y/o metadona), cinco que mencionan intoxicaciones solo por cocaína, y catorce que estudian sobredosis producidas tras el consumo de cocaína y opiáceos en el período 1999-2018.

Las concentraciones medias de *morfina* oscilan entre 0,014 µg/mL (16 casos positivos) y 1,12 µg/mL (7 casos positivos), las de *6-acetilmorfina* oscilan entre 0,004 µg/mL (1 caso positivo) y 2,54 µg/mL (3 casos positivos), las de *EDDP* oscilan entre 0,018 µg/mL (5 casos positivos) y 0,062 µg/mL (300 casos positivos) y las de *metadona* oscilan entre 0,43 µg/mL (998 casos positivos) y 1,92 µg/mL (174 casos positivos).

Las concentraciones medias de *cocaína* oscilan entre 0,030 µg/mL (111 casos positivos) y 125 µg/mL (1 caso positivo), las de *benzoilecgonina* oscilan entre 0,024 µg/mL (8 casos positivos) y 15,6 µg/mL (1

caso positivo) y las de *cocaetileno* oscilan entre 0,0015 µg/mL (2 casos positivos) y 0,061 µg/mL (3 casos positivos).

Si se comparan las concentraciones medias reflejadas en las dos últimas filas de la **Tabla 4.14**, se deduce que los resultados obtenidos en este trabajo son mayores para morfina y EDDP, y menores para 6acetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína y metadona.

Tabla 4.15. Revisión bibliográfica: concentraciones medias (µg/mL), número de casos positivos y/o intervalos de concentración de las drogas en fluido oral de consumidores

Referencia (Nº casos)	Morfina	6AM	BEG	Cocaína	Cocaetileno	EDDP	Metadona
Moolchan, 2000			0,054 0,004- 0,14	0,031 0,005-0,17			
Presley, 2003 32 casos	0,75 (32+) 0,03-4,60	0,42 (32+) 0,003-4,1					
Clauwaert, 2004 15 casos			0,059 (1+)	0,039 (7+) 0,010-0,20	0,011 (1+)		
Wylie, 2005 1396 casos	1,12 (7+) 0,009- 7,44	2,54 (3+) 0,010- 7,60	1,19 (21+) 0,005- 11,47	1,00 (22+) 0,004- 11,11	0,060 (3+) 0,025-0,12	0,018 (5+) 0,009- 0,038	1,58 (6+) 0,008-6,95
Wood, 2005 20 casos	0,89 (2+) 0,73-1,06	0,26 (2+) 0,24-0,29	0,54 (11+) 0,002-2,0	0,69 (11+) 0,012-2,0			
Dams, 2007 62 casos(opi) 130 casos (coca)	0,014 (16+) 0,001- 0,053	0,036 (45+) 0,001- 0,44	11,9 (98+) 0,001- 0,16	0,030 (111+) 0,001-0,51	0,0015 (2+) 0,0014- 0,0017		
Cone, 2007 Opi: 5739+ Coca: 1443+ Metad: 998+	0,18 (4575+) 0,002- 0,30	0,38 (3554+) 0,002- 0,037	0,10 (1193+) 0,002- 0,30	0,22 (1175+) 0,002- 0,017	0,023 (80+) 0,003-0,26	0,062 (300+) 0,001- 0,16	0,43 (998+) 0,003- 0,028
Kala, 2008 2 casos	0,069 0,045- 0,102		0,061 0,033- 0,079	0,041 0,021- 0,051			

Fritch, 2009 39 casos	0,274 (7+) 0,003- 1,80	0,063 (9+) 0,002- 0,44	0,076 (27+) 0,002- 0,43	0,104 (24+) 0,001-1,04			
Badawi, 2009 15 casos			0,047 (2+) 0,009- 0,085	0,22 (2+) 0,051-0,39			
Concheiro, 2010 41 casos	12+ 0-0,022	8+ 0-0,004	40+ 0-0,35	28+ 0-0,42			2+ 0-0,003
Heltsley, 2011 6441 casos	0,42 (619+) 0,001- 0,13		0,16 (270+) 0,002- 6,13	0,26 (313+) 0,002- 26,50		0,028 (400+) 0,001- 3,45	0,62 (462+) 0,002- 239,1
Cone, 2012 400 casos	0,076 (76+) 0,002-1,8	0,052 (68+) 0,0004- 1,24	0,17 (189+) 0,0004- 12,10	0,067 (172+) 0,0004- 2,49			
Vindenes, 2012 100 casos	22+	26+	18+	21+			8+
Voas, 2013 5908 casos				225+			
Liu, 2015 62 casos	18+ 0,0058- 0,31	5+ 0,0034- 0,18				50+ 0,00049- 0,035	57+ 0,0058- 0,026
Montesano, 2015 2 casos	0,16 (1+) 0-0,32	0,004 (1+) 0-0,008	1,15 (2+) 0,23-2,08	0,32 (2+) 0,024-0,62			
Valen, 2017 2600 casos	489+	329+		95+			1399+
Tang, 2018 491 casos	0,55 (239+) 0,005- 16,34	0,59 (197+) 0,0011- 25,44	0,024 (8+) 0,0014- 0,059	0,12 (9+) 0,0012- 0,75			1,92 (174+) 0,0051- 23,61
Fiorentin, 2018 64 casos			0,044 0,0017- 0,58	0,047 0,0018- 0,45			

Rangos de niveles medios en fluido oral	0,014-1,12	0,004-2,54	0,024-15,6	0,030-125	0,0015-0,060	0,018-0,062	0,43-1,92
Este trabajo 29 casos	1,65 (7+) 0,49-3,04	0,46 (3+) 0,12-1,07	0,58 (20+) 0,05-1,57	0,69 (19+) 0,05-2,99	0,052 (6+) 0,05-0,06	0,86 (7+) 0,20-1,82	1,68 (11+) 0,13-5,80

4.3.3. Referencias

Aps JKM, Martens LC. *Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva*. Forensic Sci Int, 150: 119-131 (2005).

Badawi N, Wiese Simonsen K, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. *Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultra performance LC-MS/MS*. Clin Chem, 55: 2004–2018 (2009).

Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. *Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization-Mass Spectrometry (GC/PCI-MS)*. J Anal Toxicol, 27: 270–274 (2003).

Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. *Use of Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Positive Chemical Ionization for the determination of opiates in human oral fluid*. Rapid Commun Mass Spectrom, 20: 1288–1292 (2006).

Clauwaert KM, Decaestecker T, Mortier K, Lambert W, Deforce D, Van Peteghem C, Van Bocxlaer J. *The determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 28: 655-659 (2004).

Cognard E, Bouchonnet S, Staub C. *Validation of a gas chromatography-Ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in saliva*. J Pharm Biomed Anal, 41: 925–934 (2006).

Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. *High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 398: 915–924 (2010).

Concheiro M, De Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *Confirmation by LC-MS of drugs in oral fluid obtained from roadside testing*. Forensic Sci Int, 170: 156-162 (2007).

Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 391: 2329–2338 (2008).

Cone EJ. *Oral fluid results compared to self reports of recent cocaine and heroin use by methadone maintenance patients*. Forensic Sci Int, 215: 88-91 (2012).

Cone EJ, Presley L, Lehrer M, Seiter W, Smith M, Kardos KW, Fritch D, Salamone S, Niedbala RS. *Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations*. J Anal Toxicol, 26: 541–546 (2002).

Cone EJ. *Prevalence and disposition of drugs of abuse and opioid treatment drugs in oral fluid*. J Anal Toxicol, 31: 424-433 (2007).

Dams R, Choo RE, Lambert WE, Jones H, Huestis MA. *Oral fluid as an alternative matrix to monitor opiate and cocaine use in substance-abuse treatment patients*. Drugs Alc Depend, 87: 258-267 (2007).

Dams R, Murphy CM, Choo RE, Lambert WE, De Leenheer AP, Huestis MA. *LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation*. Anal Chem, 75: 798-804 (2003).

De Jager L, Andrews ARJ. *Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in saliva using hollow fiber membrane solvent microextraction*. Anal Chim Acta, 458: 311–320 (2002).

Di Corcia D, Lisi S, Pirro V, Gerace E, Salomone A, Vincenti M. *Determination of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 927: 133-141 (2013).

Fernández P, Morales L, Vázquez C, Lago M, Bermejo AM. *Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography*. J Appl Toxicol, 28: 998-1003 (2008).

Fiorentin TR, Nichterwitz Scherer J, Alexandre Marcelo MC, Vieira Sousa TR, Pechansky F, Flores Ferrao M, Pereira Limberger R. *Comparison of cocaine/crack biomarkers concentrations in oral fluid, urine and plasma simultaneously collected from drug users*. J Anal Toxicol, 42: 69-76 (2018).

Foulon C, Menet M-C, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude J-R, Guyon F. *Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high-performance liquid chromatography with diode-array detector*. Chromatographia, 50: 721-727 (1999).

Fritch D, Blum K, Nonnemacher S, Haggerty BJ, Sullivan MP, Cone EJ. *Identification and quantitation of amphetamines, cocaine, opiates and phencyclidine in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Anal Toxicol, 33: 569-577 (2009).

Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M. *Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique*. Forensic Sci Int, 134: 40-45 (2003).

Grabenaue M, Moore KN, Bynum ND, White RM, Mitchell JM, Hayes ED, Flegel R. *Development of a quantitative LC-MS-MS assay for codeine, morphine, 6-acetylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone and oxymorphone in neat oral fluid*. J Anal Toxicol, 42: 392-399 (2018).

Heltsley R, DePriest A, Black DL, Robert T, Marshall L, Meadors VM y col. *Oral fluid drug testing of chronic pain patients. I. Positive prevalence rates of licit and illicit drugs*. J Anal Toxicol, 35: 529-540 (2011).

Jenkins AJ, Oyler JM, Cone EJ. *Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma*. J Anal Toxicol, 19: 359-374 (1995).

Jones J, Tomlinson K, Moore C. *The simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, 6-acetylmorphine and oxycodone in hair and oral fluid*. J Anal Toxicol, 26: 171-175 (2002).

Jufer R, Walsh SL, Cone EJ, Sampson-Cone A. *Effect of repeated cocaine administration on detection times in oral fluid and urine*. J Anal Toxicol, 30: 458-462 (2006).

Kadehjian L. *Legal issues in oral fluid testing*. Forensic Sci Int, 150: 151-160 (2005).

Kala SV, Harris SE, Freijo TD, Gerlich S. *Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral*

fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Anal Toxicol, 32: 605-611 (2008).

Kato K, Hillsgrove M, Weinhold L, Gorelick DA, Darwin WD, Cone EJ. *Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and non-stimulated conditions*. J Anal Toxicol, 17: 338-341 (1993).

Liu H-C, Lee H-T, Hsu Y-C, Huang M-H, Liu RH, Chen T-J, Lin D-L. *Direct injection LC-MS-MS analysis of opiates, methamphetamine, buprenorphine, methadone and their metabolites in oral fluid from substitution therapy patients*. J Anal Toxicol, 39: 472-480 (2015).

Lund HME, Øiestad EL, Gjerde H, Christophersen AS. *Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits – Stability testing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis*. J Chromatogr B, 879: 3367-3377 (2011).

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Galichet LY. *Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceutical, body fluids and postmortem material*. Pharmaceutical Press. London. 2004.

Montesano C, Simeoni MC, Curini R, Sergi M, Lo Sterzo C, Compagnone D. *Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 407: 3647-3658 (2015).

Moolchan ET, Cone EJ, Vstadik A, Huestis MA, Preston KL. *Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis*. J Anal Toxicol, 24: 458-466 (2000).

Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP. *Simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Chromatogr B, 779: 321-330 (2002).

Niedbala RS, Kardos K, Fries T, Cannon A, Davis A. *Immunoassay for detection of cocaine/metabolites in oral fluids*. J Anal Toxicol, 25: 62-68 (2001).

Øiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. *Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Clin Chem 53 (2): 300-309 (2007).

Presley L, Lehrer M, Seiter W, Hahn D, Rowland B, Smith M, Kardos KW, Fritch D, Salamone S, Niedbala RS, Cone EJ. *High prevalence of*

6-acetylmorphine in morphine-positive oral fluid specimens. Forensic Sci Int, 133: 22-25 (2003).

Ranjbari E, Golbabanezhad-Azizi A-A, Hadjmohammadi MR. *Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography*. Talanta, 94: 116-122 (2012).

Tang MHY, Ching CK, Poon S, Chan SSS, Ng WY, Lam M, Wong CK, Pao R, Lau A, Mak TWL. *Evaluation of three rapid oral fluid test devices on the screening of multiple drugs of abuse including ketamine*. Forensic Sci Int, 286: 113-120 (2018).

Valen A, Øiestad AML, Strand DH, Skari R, Berg T. *Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS*. Drug Test Anal, 9: 808-823 (2017).

Vindenes V, Lund HME, Andresen W, Gjerde H, Ikdahl SE, Christophersen AS, Øiestad EL. *Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers*. Forensic Sci Int, 219: 165-171 (2012).

Voas RB, Lacey JH, Jones K, Scherer M, Compton. *Drinking drivers and drug use on weekend nights in the United States*. Drug Alc Depend, 130: 215-221 (2013).

Wang IT, Feng Y-T, Chen C-Y. *Determination of 17 illicit drugs in oral fluid using isotopic dilution ultra-high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry with three atmospheric pressure ionizations*. J Chromatogr B, 878: 3095-3105 (2010).

Wood M, Laloup M, Ramírez Fernández MM, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, De Boeck G, Samyn N. *Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Forensic Sci Int, 150: 227-238 (2005).

Wylie FM, Torrance H, Seymour A, Buttress S, Oliver JS. *Drugs in oral fluid. Part II. Investigation of drugs in drivers*. Forensic Sci Int, 150: 199-204 (2005).

Zeng Y, Sparve E, Bergstrom. *A simple validated multi-analyte method for detecting drugs in oral fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)*. Drug Test Anal, 10: 1001-1008 (2018).

4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTIDEPRESIVOS

En primer lugar, se optimizaron las condiciones cromatográficas para separar los siguientes antidepresivos: mirtazapina, venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina. Se comenzó probando varias columnas cromatográficas con rellenos similares a los publicados por otros autores, utilizando siempre una misma fase móvil, a base de acetonitrilo y tampón fosfato pH 3,0: las columnas *XTerra RP8* (Castaing y col, 2007), *Sun Fire C18* (De Castro y col, 2008) y *XBridge C18* (Choong y col, 2011; Ansermot y col, 2012) permitían obtener unas buenas respuestas cromatográficas usando LC-MS. Sin embargo, con nuestro detector PDA, fue necesario hacer algunas modificaciones. La determinación de los antidepresivos se realiza con un cromatógrafo Waters® Acquity UPLC H-Class conectado a un detector Waters® Acquity de matriz de fotodiodos. Las muestras son inyectadas en una columna de acero inoxidable Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (100 mm x 2,1 mm ID, 1,7 µm de tamaño de partícula). A continuación, se procedió a la optimización de la fase móvil, probando diferentes gradientes y modificando los porcentajes de acetonitrilo y tampón fosfato, la concentración y pH de este último, y el flujo de la fase móvil. Finalmente, la fase móvil idónea resultó ser una mezcla de ACN (A) y tampón fosfato 0,05M, pH 3 (B), con un flujo de 0,4 mL/min, en modo gradiente: 20% A (0 min), 40% A (0-0,7 min), 45% A (0,7-1,8 min), 30% A (1,8-2,0 min), 25% A (2,0- 2,2 min) y 20% A (2,2-3 min) para obtener una óptima resolución en un tiempo corto de análisis. En base a los espectros de absorción de los seis antidepresivos, las longitudes de onda de trabajo fueron: 250,9 nm para mirtazapina, 225,8 nm para venlafaxina, 239,3 nm para escitalopram, 252,1 nm para fluvoxamina, 227,0 nm para fluoxetina y 273,6 nm para sertralina. La identificación de los fármacos se basa en sus tiempos de retención utilizando el sistema UPLC-PDA (0,95 min para mirtazapina, 1,39 min para venlafaxina, 1,73 min para escitalopram, 2,01 min para fluvoxamina, 2,22 min para fluoxetina y 2,28 min para sertralina) y en sus espectros de absorción (Figura 4.18).

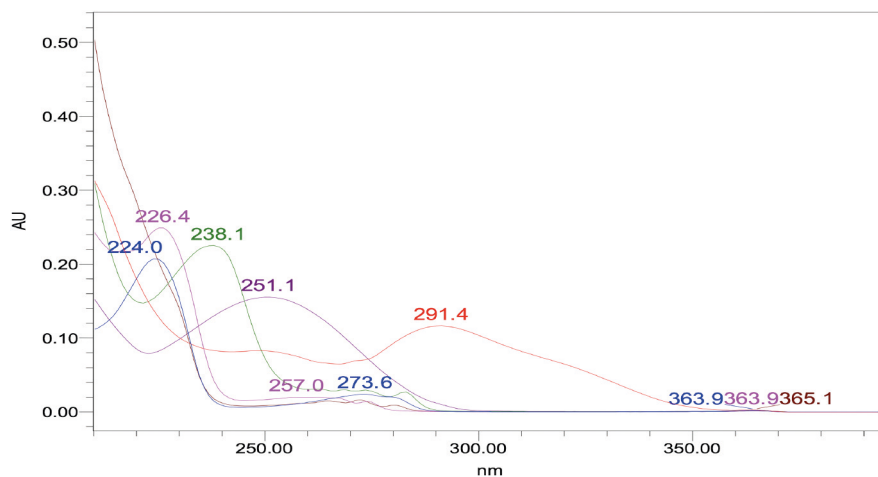


Figura 4.18: Espectros de absorción correspondientes a la Mirtazapina (rojo), Venlafaxina (azul), Escitalopram (verde), Fluvoxamina (violeta), Fluoxetina (rosa) y Sertralina (marrón)

4.5 ENSAYOS DE ANTIDEPRESIVOS EN PLASMA

4.5.1 Optimización de la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). Diseño experimental

Un diseño experimental consiste en una serie de ensayos en los que se hacen determinados cambios en las variables del proceso, para observar el efecto de dichos cambios en la respuesta obtenida. Por tanto, son conjuntos de experiencias diseñadas con el objetivo de evaluar la superficie de respuesta, planificando un número mínimo de experimentos, que constituyen la matriz de experiencias (**Ryan, 2007; Lewis y col, 1999; Kobilinsky, 1997**). En cualquier tipo de análisis, la función de respuesta se suele ajustar a un polinomio de primer o segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n + \beta_{11} x_{12} + \dots + \beta_{nn} x_{n2} + \beta_{1n} x_1 x_n + \dots + \beta_{n1} x_n x_1$$

donde Y es la respuesta, y x_n son los diferentes factores de los que depende la respuesta. Los coeficientes β tienen el siguiente significado: β_0 es el término constante; β_n es el efecto lineal del factor n ; β_{1n} es el efecto de la interacción de dos factores; y β_{nn} es el efecto cuadrático del factor n -ésimo. La evaluación de estos coeficientes determina la importancia que tiene cada factor, así como las posibles interacciones entre factores diferentes.

La optimización mediante un diseño experimental se debe comenzar con unas experiencias preliminares para obtener información acerca del dominio experimental de trabajo, y continuar con un screening de factores o determinación de los factores que afectan al sistema, un estudio cuantitativo de factores para obtener mayor información, un estudio de superficie de respuesta con el fin de prever, en cualquier punto del campo experimental de interés, el valor de la respuesta, y una optimización numérica mediante funciones de deseabilidad, para encontrar las condiciones que proporcionan la mejor respuesta, utilizando programas informáticos (**Phan Than Luu, 1993**).

En primer lugar, se llevan a cabo una serie de experiencias preliminares para disminuir el número de factores a incluir en un estudio posterior de optimización del proceso. A continuación se muestra un protocolo inicial (**Figura 4.19**), con el que se realizan estos estudios sobre pH de la

extracción, disolvente dispersante, disolvente extractante, tipo de agitación y adición de sal (cloruro sódico).

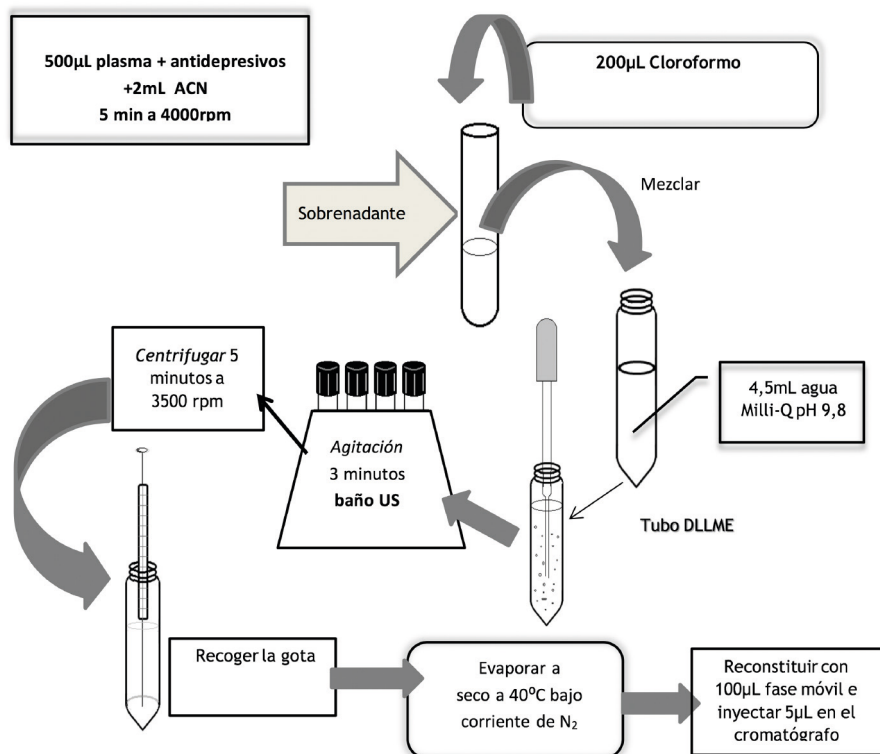


Figura 4.19. Protocolo previo al diseño de experimentos para la DLLME con antidepresivos (venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina)

4.5.1.1 Estudio del dispersante

Para este estudio se usó un protocolo de extracción con unas condiciones generales utilizando 0,5 mL de plasma con adición de 1 µg/mL de la disolución patrón de mezcla de ATD y 2 mL del disolvente de dispersión evaluado. Tras la centrifugación, se transfirió el sobrenadante a otro vial y se añadieron rápidamente 100 µL de cloroformo, como extractante y 4,5 mL de agua. Esta disolución fue sonicada 3 min y centrifugada. Después se tomó la gota, que se

evaporó a sequedad, se re-constituyó con 100 μL de fase móvil y se inyectaron 5 μL en el UPLC.

Los disolventes dispersantes que se estudiaron fueron: acetonitrilo, acetona y metanol. Estos tres disolventes actúan con una doble función ya que se usan para precipitar las proteínas plasmáticas, antes de proseguir con la extracción. La **Figura 4.20** muestra que los mejores resultados se obtienen con acetonitrilo para todos los antidepresivos, por lo tanto es el dispersante seleccionado.

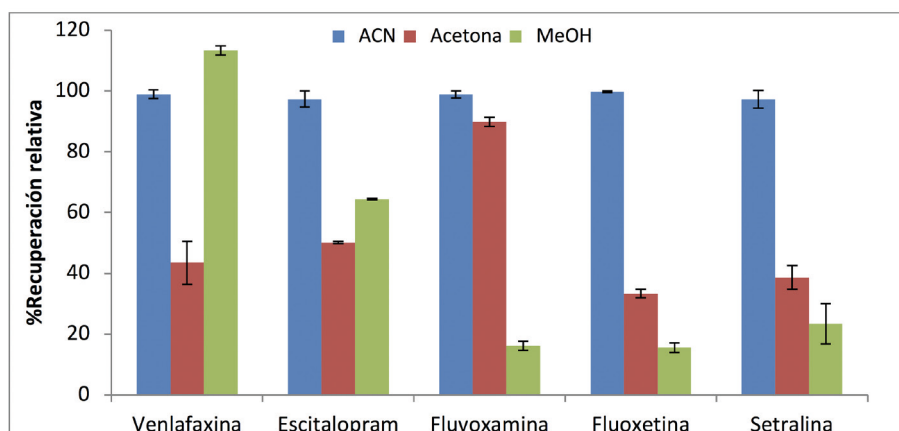


Figura 4.20. Estudio comparativo de varios dispersantes para la DLLME

4.5.1.2 Estudio del extractante

En este apartado se pretende elegir el mejor extractante para llevar a cabo la microextracción. Los disolventes estudiados son: cloroformo (CHCl_3), tetracloruro de carbono (CCl_4), tetracloruro de etileno (C_2Cl_4), clorobenceno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$), diclorometano (CH_2Cl_2) y dicloroetano ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$). En la **Figura 4.21** se muestran los resultados obtenidos. Para la venlafaxina, escitalopram y fluvoxamina se obtienen recuperaciones similares cuando se utiliza cloroformo o diclorometano. Sin embargo, para la fluoxetina y la sertralina las mejores recuperaciones se obtienen con cloroformo, por lo tanto éste ha sido el extractante seleccionado.

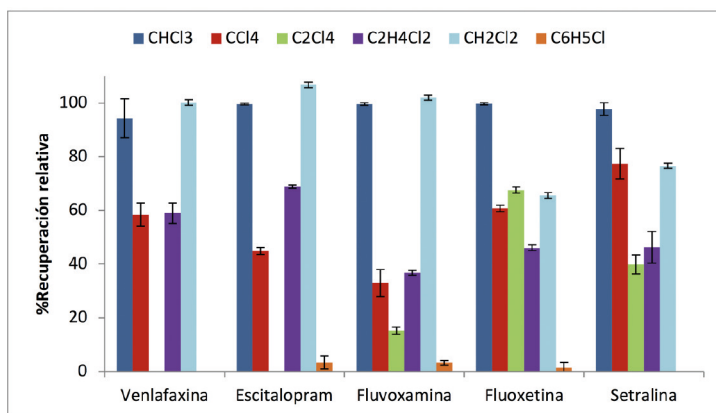


Figura 4.21. Estudio comparativo de varios extractantes para la DLLME

4.5.1.3 Estudio del modo de agitación

A continuación se probaron diferentes modos de agitación: ultrasonidos (US), manual, vortex y sin agitación. El tiempo se mantiene constante en 3 minutos para los diferentes tipos de agitación. La **Figura 4.22** muestra que existen bastantes similitudes en los resultados obtenidos para la venlafaxina, escitalopram y fluvoxamina usando los diferentes modos de agitación, sin embargo, los ultrasonidos proporcionan unas mejores recuperaciones en el caso de la fluoxetina y sertralina, por lo tanto se ha elegido la agitación con ultrasonidos.

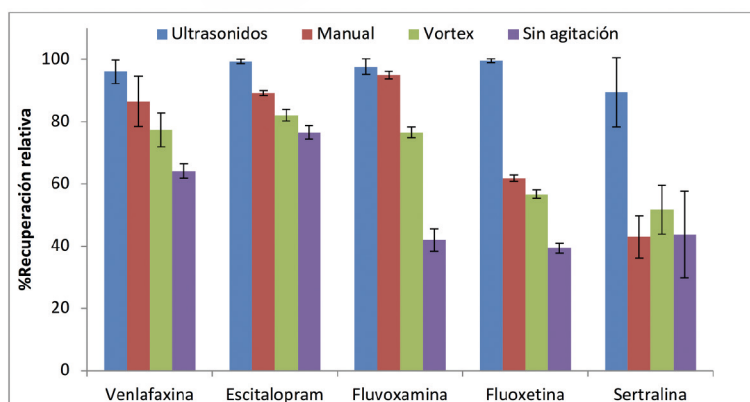


Figura 4.22. Estudio comparativo de varios tipos de agitación para la DLLME

Una vez elegido el modo de agitación, se ha variado el tiempo entre 3 y 5 min para llevar a cabo la extracción. La **Figura 4.23** indica que al aumentar el tiempo de agitación, se produce un efecto negativo sobre la eficacia de la extracción, por lo tanto se selecciona el tiempo de 3 minutos.

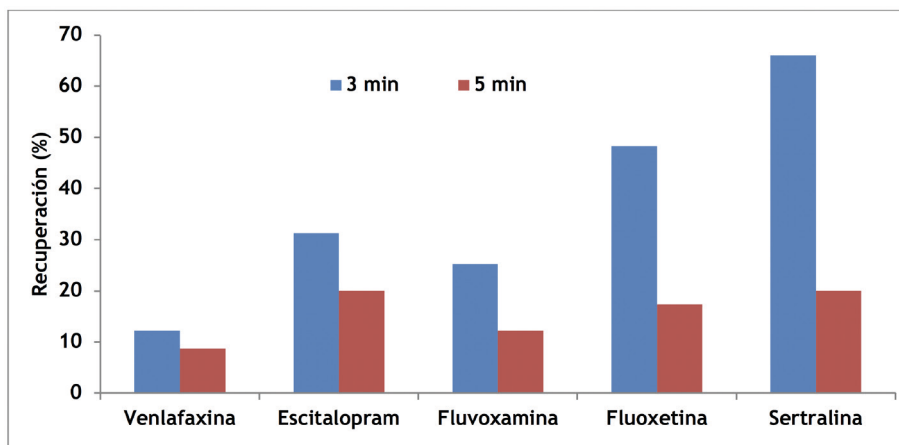


Figura 4.23. Estudio comparativo de varios tiempos de agitación con ultrasonidos

4.5.1.4 Estudio de la adición de sal

En este apartado se ha estudiado la necesidad o no de adicionar sal para llevar a cabo la extracción. Dependiendo de la naturaleza de los analitos, la adición de la sal en la muestra puede tener varios efectos, como por ejemplo disminuir la solubilidad y como consecuencia mejorar el proceso de extracción a causa del efecto *salting-out* (**Psillakis, 2003**). El efecto de la fuerza iónica ha sido estudiado sin añadir NaCl y añadiendo 0,5 g de NaCl (**Figura 4.24**). Para la fluvoxamina, fluoxetina y sertralina se obtienen mejores recuperaciones sin la adición de sal. Por el contrario, para venlafaxina y escitalopram los resultados con adición y sin adición de sal son similares. La razón puede ser que el extractante disminuya su solubilidad en la fase acuosa y esto se refleja en una gota más grande, disminuyendo la recuperación. Por lo tanto, se determinó que es más favorable no adicionar sal.

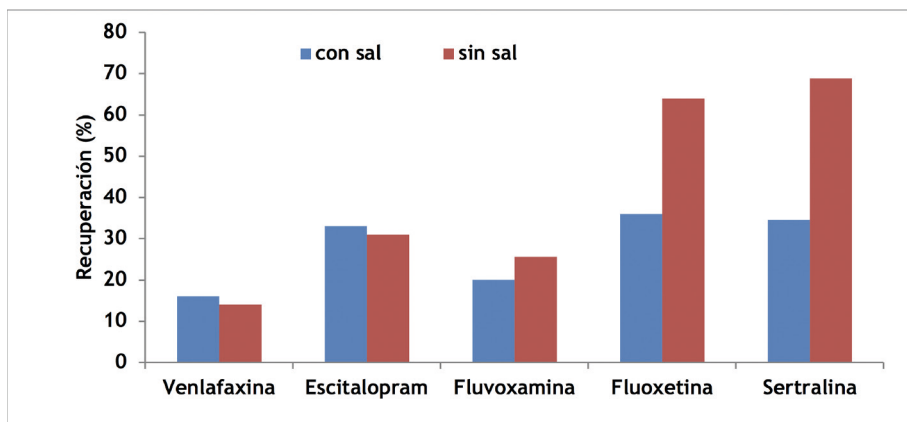


Figura 4.24. Estudio comparativo de la DLLME con y sin adición de sal

4.5.1.5 Diseño de screening

Para estudiar la influencia de algunos factores en el proceso de extracción se realiza inicialmente un diseño de screening (**Tabla 4.16**). La matriz de experiencias y el plan de experimentación se muestran en las **Tablas 4.17 y 4.18**, respectivamente.

Tabla 4.16. Dominio experimental

	Factor	Número de niveles	Niveles
U1	pH	3	7,36
			8,34
			9,50
U2	Volumen ACN (mL)	3	1
			2
			3
U3	Volumen cloroformo (mL)	3	50
			100
			200
U4	Tiempo US (min)	3	1
			2
			3

Tabla 4.17. Matriz de experiencias

Nº Exp	X1	X2	X3	X4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	2	3
9	3	3	1	1

X1: pH, X2: volumen acetonitrilo, X3: volumen cloroformo, X4: tiempo US

Tabla 4.18. Plan de experimentación

Nº exp	Rand	pH	Vol ACN (mL)	Vol cloroformo (µL)	Tiempo US (min)
1	4	7,36	1	50	1
2	8	7,36	2	100	2
3	7	7,36	3	200	3
4	9	8,34	1	100	3
5	1	8,34	2	200	1
6	6	8,34	3	50	2
7	3	9,50	1	200	2
8	2	9,50	2	50	3
9	5	9,50	3	100	1

Las respuestas a los experimentos, como áreas de los picos cromatográficos obtenidos para las muestras (Tabla 4.19), se han analizado con el programa NemrodW (Mathieu y col, 2000).

Tabla 4.19. Áreas de los picos cromatográficos obtenidas en este diseño

Núm exp	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Fluoxetina	Sertralina
1	4982	20575	30663	47831	746
2	17121	341293	147936	335309	18178
3	38503	472196	252608	477182	24185
4	39477	405767	218684	314771	16572
5	35442	411391	188195	299364	23170
6	0	0	0	0	0
7	41538	383108	148533	195395	10973
8	0	17191	0	2988	0
9	24541	294912	132043	273235	15203

La influencia de los distintos niveles de cada factor sobre la respuesta de cada compuesto se observan mediante los gráficos de pesos delta y los gráficos de efectos totales (**Figuras 4.25-4.29**).

Pesos delta

Se representan los efectos relativos cuando se produce un cambio de nivel para cada variable. La longitud de las barras es proporcional a la amplitud de efecto relativo. Las barras se dirigen hacia la derecha cuando el efecto es positivo y hacia la izquierda cuando es negativo. Las líneas discontinuas indican los límites de significación estadística. Si las barras de los efectos sobrepasan estas líneas, el efecto del nivel considerado, es estadísticamente significativo sobre la respuesta estudiada.

Efectos totales

Son gráficos que permiten comparar los efectos relativos sobre la respuesta de un cambio de nivel en una variable. Se representan bajo la forma de diagrama de barras en los que la longitud de cada barra es proporcional al valor del efecto de cada nivel del factor sobre la respuesta.

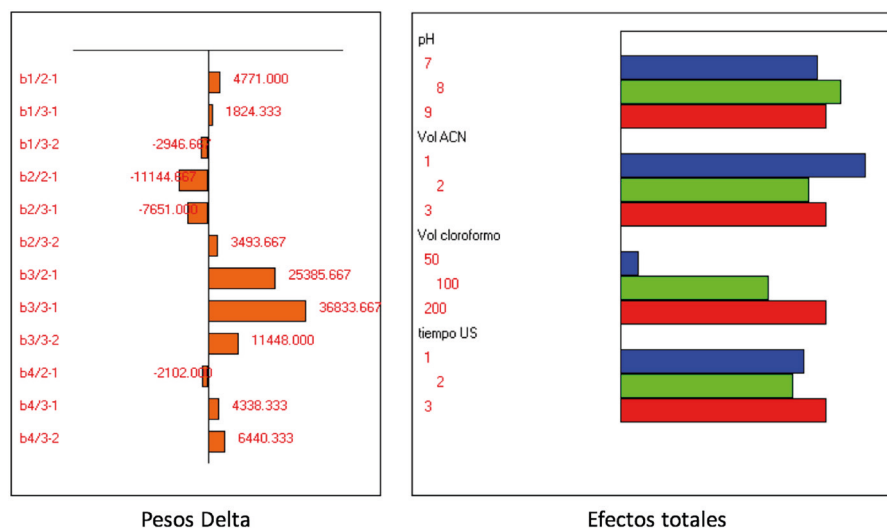


Figura 4.25. Influencia de los factores para la venlafaxina

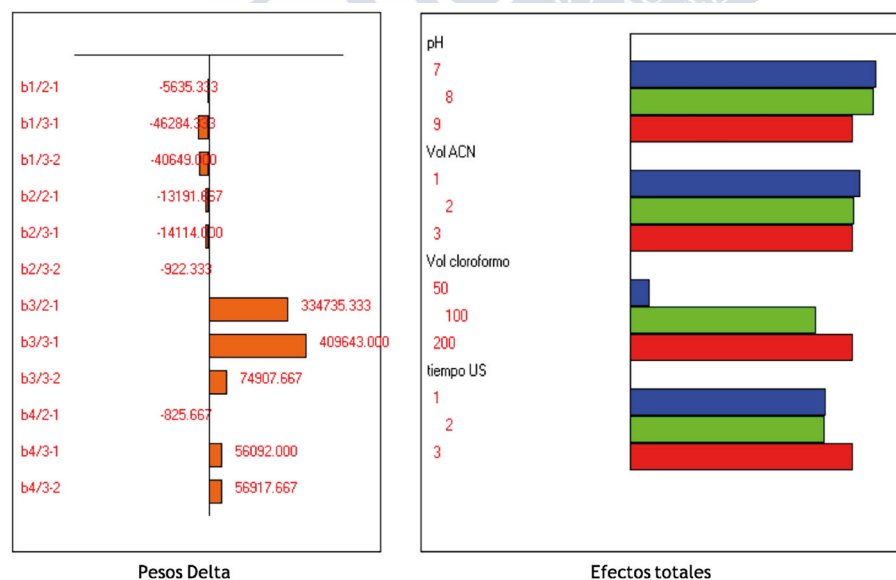


Figura 4.26. Influencia de los factores para el escitalopram

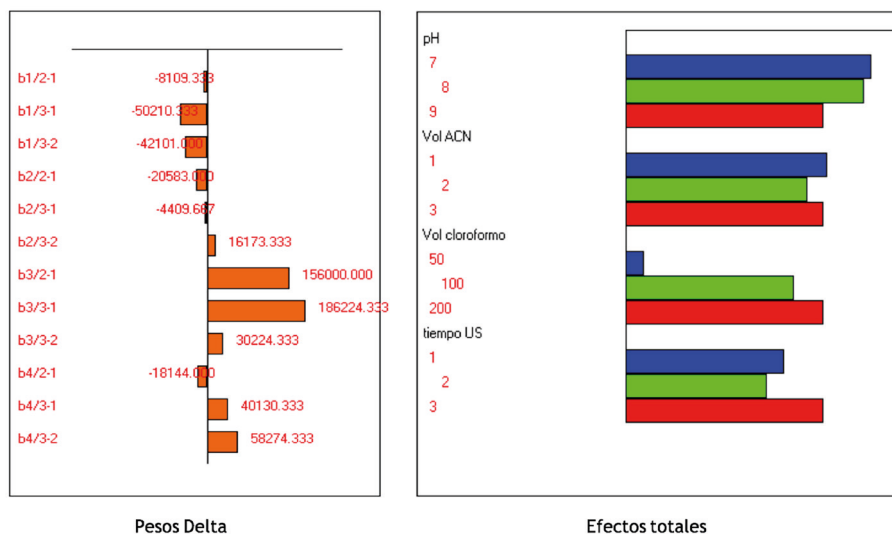


Figura 4.27. Influencia de los factores para la fluvoxamina

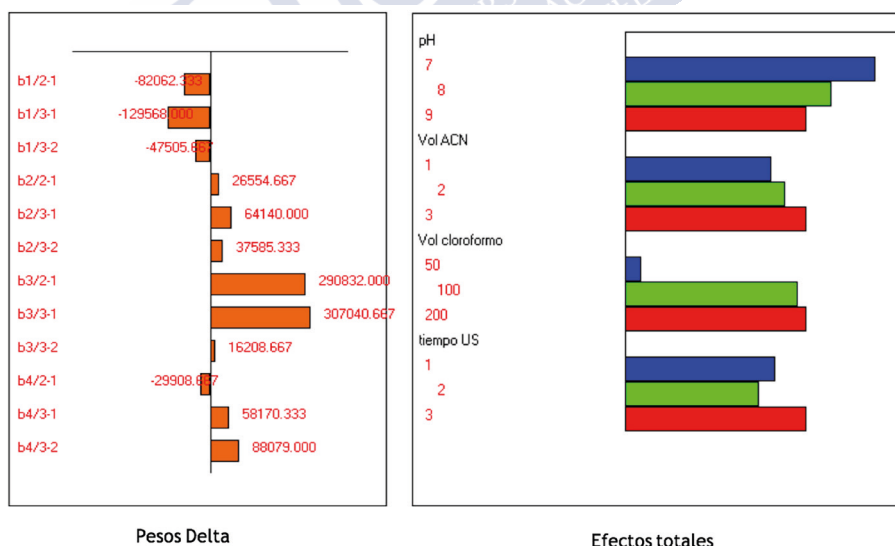


Figura 4.28. Influencia de los factores para la fluoxetina

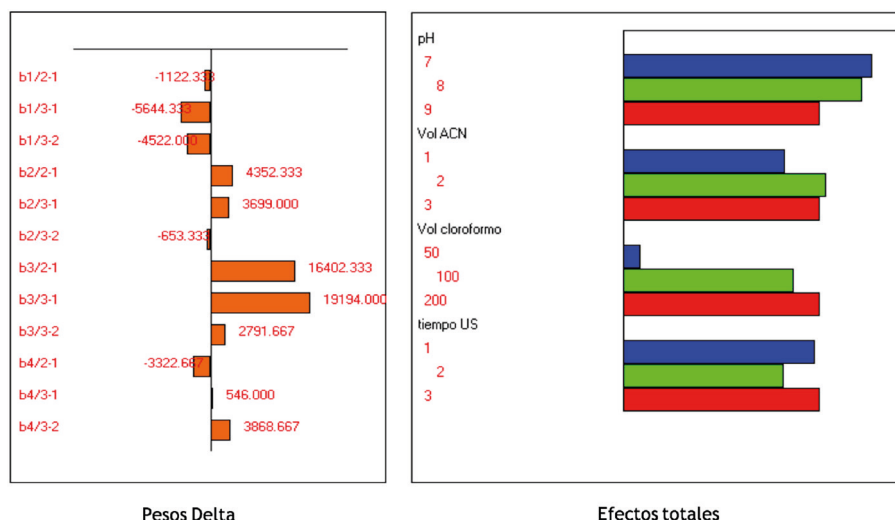


Figura 4.29. Influencia de los factores para la sertralina

Aunque no aparece ningún efecto estadísticamente significativo en las gráficas de Pesos Delta (**Figuras 4.25-4.29**) se pueden sacar las siguientes conclusiones:

Tiempo US: usando 3 min de US se obtienen mejores resultados (barras más largas) para venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina y fluoxetina. Los resultados para sertralina fueron similares usando 1 o 3 min, pero mejores que con 2 min. Por tanto, se tomaron 3 min de US como el tiempo más adecuado.

pH: en esta variable los datos no son concluyentes, pH 8 fue mejor para venlafaxina, pero pH 7 favorece la extracción de fluoxetina. En los otros casos, pH 7 y 8 permiten obtener resultados similares.

Volumen ACN: en esta variable los datos no son concluyentes pues 1 mL proporciona el mejor resultado para venlafaxina, mientras que en los otros casos no es significativa la diferencia de volumen.

Volumen cloroformo: se observa que al cambiar del nivel bajo de volumen de cloroformo (50 μ L) a uno más alto (200 μ L) se produce un

efecto positivo en las respuestas. Se observó que 200 μ L conduce a una respuesta superior en todos los compuestos.

Por tanto, en base a los gráficos de pesos delta y efectos totales se fijan las siguientes condiciones:

- 200 μ L de cloroformo
- 3 minutos en el baño de ultrasonidos

Las variables de pH y volumen de acetonitrilo fueron optimizadas con un diseño tipo pentágono de superficie de respuesta para profundizar en el estudio de estas dos variables.

4.5.1.6 Diseño de superficie de respuesta

El dominio experimental se muestra en la **Tabla 4.20**, según el cual el volumen de ACN se estudió en el intervalo de 0,8 y 3,5 mL, mientras que el pH fue estudiado entre 7,1 y 9,7. La matriz de experiencias en la **Tabla 4.21** y el diseño de experimentos en la **Tabla 4.22**.

Tabla 4.20. Dominio experimental para el diseño pentágono

	Factor	Centro	Niveles de variación
U1	Volumen ACN	2,0	1,5
U2	pH	8,4	1,4

Tabla 4.21. Matriz de experiencias para el diseño pentágono

Nº Exp	X1	X2
1	1,00000	0,00000
2	0,30902	0,95106
3	-0,80902	0,58779
4	-0,80902	-0,58778
5	0,30902	-0,95106
6	0,00000	0,00000
7	0,00000	0,00000
8	0,00000	0,00000

Tabla 4.22. Plan de experimentación para el diseño pentágono

Nº Exp	Rand	Vol ACN (mL)	pH
1	1	3,5	8,4
2	2	2,5	9,7
3	8	0,8	9,2
4	5	0,8	7,6
5	4	2,5	7,1
6	6	2,0	8,4
7	3	2,0	8,4
8	7	2,0	8,4

Las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para las muestras procedentes de las experiencias del diseño (**Tabla 4.23**) se han analizado con el programa NemrodW (**Mathieu y col, 2000**), y a partir de estos resultados se obtienen las superficies de respuesta mostradas en las **Figuras 4.30-4.34**.

Tabla 4.23. Áreas de los picos cromatográficos obtenidas en el diseño pentágono

Núm. exp	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Fluoxetina	Sertralina
1	20575	520624	249405	460611	24576
2	41222	648835	298550	441430	27649
3	59843	247486	80736	124721	9357
4	25245	133123	33940	53806	2689
5	9924	504560	201450	513123	23312
6	17074	552669	212015	301604	17002
7	54287	535707	197271	271909	23605
8	53633	527953	178383	281782	19615

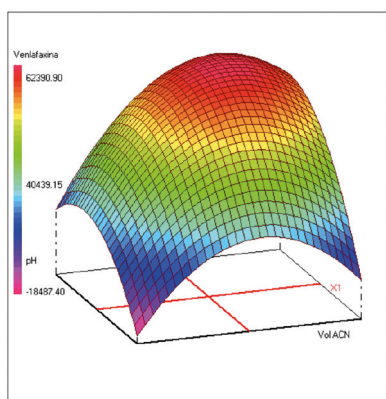


Figura 4.30. Variación de la respuesta de la venlafaxina en el plano pH-vol ACN

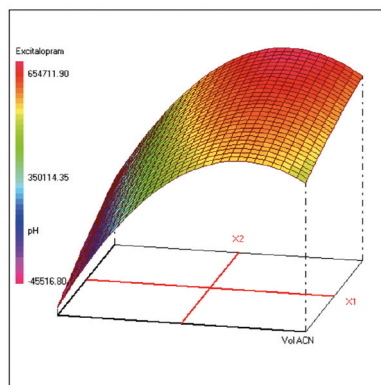


Figura 4.31. Variación de la respuesta del escitalopram en el plano pH-vol ACN

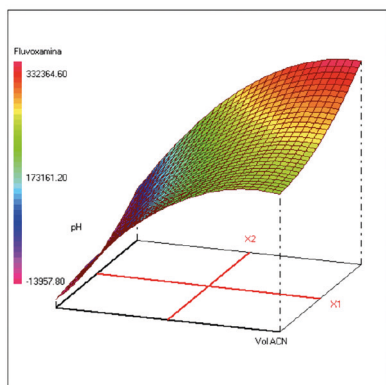


Figura 4.32. Variación de la respuesta de la fluvoxamina en el plano pH-vol ACN

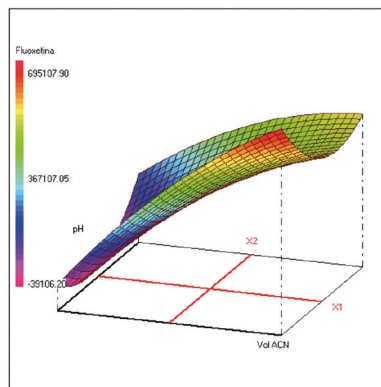


Figura 4.33. Variación de la respuesta de la fluoxetina en el plano pH-vol ACN

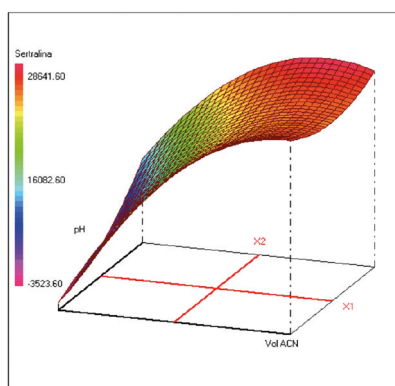


Figura 4.34. Variación de la respuesta de la sertralina en el plano pH-vol ACN

En la **Figura 4.30** se puede ver la superficie de respuesta de la venlafaxina en el plano pH-volumen ACN. La gráfica indica que la extracción de dicho antidepresivo se realiza mejor a un pH medio-alto y un volumen intermedio de ACN. La extracción del escitalopram (**Figura 4.31**) podría realizarse a cualquier pH y con un volumen intermedio-alto de ACN. Para la fluvoxamina (**Figura 4.32**) las condiciones óptimas de extracción se obtienen con valores altos de ambos factores. La fluoxetina (**Figura 4.33**), sin embargo, se extrae mejor a pH bajo y con un volumen alto de ACN. Finalmente para la sertralina (**Figura 4.34**) se puede ver que las condiciones óptimas se obtienen a cualquier pH y con un volumen alto de ACN. Por lo tanto, se concluye que:

La extracción de todos los antidepresivos se realiza eficazmente a volúmenes intermedios-altos de acetonitrilo. Para la venlafaxina, y la fluvoxamina se obtienen mejores resultados a pH altos. En el caso del escitalopram las condiciones de extracción óptimas se consiguen a pH intermedios-altos. La fluoxetina se extrae mejor a pH bajos. La extracción de la sertralina se podría realizar a cualquier pH.

En problemas de optimización multi-respuesta se busca encontrar una solución de compromiso donde todas las respuestas tengan su valor óptimo. Por lo que se recurre a utilizar un algoritmo basado en funciones de deseabilidad mediante el software NemrodW. Este algoritmo permite la obtención de condiciones óptimas de extracción simultánea de los compuestos estudiados sin realizar experiencias adicionales. Para ello, se propone una función de transformación de las respuestas que tengan un grado de conformidad adecuado para cada respuesta. Se define la función de deseabilidad $d_j = d(Y_j)$ ($j = 1, \dots, r$) para cada respuesta y una D global calculada como la media geométrica de las deseabilidades individuales d_j . Cuando d_j se aproxima a 0 indica la ausencia de conformidad con la respuesta deseada y cuando d_j se aproxima a 1 indica total conformidad.

En la gráfica 3D (**Figura 4.35**) se observa una zona alta de meseta donde se encontrarán los valores óptimos de extracción de los antidepresivos para los factores estudiados. Se puede ver que la mejor respuesta se obtiene para pH altos y volúmenes intermedios-altos. En la gráfica 2D (**Figura 4.36**) se muestra que la deseabilidad está próxima a 1 con valores altos de pH y volúmenes intermedios-altos de ACN.

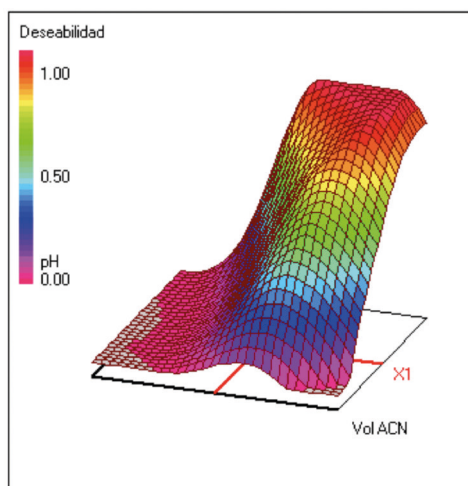


Figura 4.35. Variación de la deseabilidad en el plano: pH-vol ACN. Gráfico en 3D

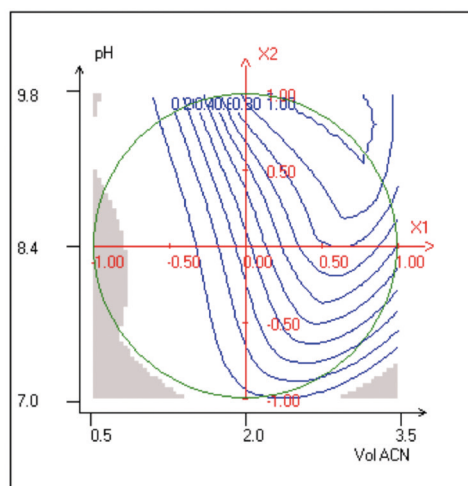


Figura 4.36. Variación de la deseabilidad en el plano: pH-vol ACN. Gráfico en 2D

En la **Tablas 4.24 y 4.25** se muestran las coordenadas del máximo y sus características.

Tabla 4.24. Coordenadas del máximo

Variable	Valor	Factor	Valor
X1	0,628728	Vol. ACN	2,9
X2	0,777625	pH	9,5

Tabla 4.25. Características del máximo

Respuesta	Nombre de la respuesta	Valor	d _i (%)	Peso	d _i min(%)	d _i máx(%)
Y1	Venlafaxina	60286,49	100,00	1	100,00	100,00
Y2	Escitalopram	632970,45	100,00	1	100,00	100,00
Y3	Fluvoxamina	303283,94	100,00	1	100,00	100,00
Y4	Fluoxetina	442813,97	100,00	1	97,57	100,00
Y5	Sertralina	27308,55	100,00	1	99,45	100,00
	Deseabilidad		100,00		99,45	100,00

El programa estadístico proporcionó unas condiciones óptimas de 2,9 mL de ACN y pH 9,5. A la vista de la **Figura 4.35**, el óptimo aparece como una superficie en forma de meseta en la que se han buscado unas condiciones de trabajo en el laboratorio más idóneas para las que se verificaron su efectividad. Se puede concluir que las condiciones óptimas de extracción de venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina y sertralina en muestras de plasma, utilizando microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), son:

- 200 μ L de cloroformo como agente extractante
- 3 minutos de agitación en el baño de ultrasonidos
- 2,5 mL de acetonitrilo como agente dispersante
- pH de extracción 9,8.

4.5.2 Validación de los Métodos Analíticos (UPLC-PDA y UPLC-MS/MS)

4.5.2.1 Validación del método analítico (UPLC-PDA)

4.5.2.1.1 Linealidad y Análisis de regresión

Para el estudio de la linealidad del método, se preparan disoluciones-mezcla en plasma de 0,02; 0,1; 0,2; 0,4; 1; 2 y 5 μ g/mL para cada uno de los antidepresivos en estudio, se realiza la microextracción líquido-líquido dispersiva y se aplica el método cromatográfico previamente optimizado (UPLC-PDA). Como en la extracción se parte de 500 μ L de plasma y el extracto seco se reconstituye en 100 μ L de fase móvil, las concentraciones postextracción son 5 veces mayores que las concentraciones iniciales, es decir: 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 y 25 μ g/mL. A continuación se realiza un análisis de regresión y se establece una función de calibrado basada en un modelo matemático lineal del tipo $y = ax + b$, donde y es el área bajo la curva del pico cromatográfico y x es la concentración inicial. También se obtiene el coeficiente de determinación (R^2), que muestra la bondad del ajuste de la recta de calibrado, siendo igual o superior a 0,998 para los antidepresivos de interés.

En base a los criterios establecidos por la FDA (2001) y la ICH (2005) para la validación de métodos cromatográficos, se observa una

buena linealidad, tal y como se pone de manifiesto en los resultados del análisis de regresión de los antidepresivos en plasma (**Tabla 4.26**).

Tabla 4.26. Análisis de regresión de los antidepresivos en plasma

Analito	Pendiente (a)	Ordenada en el origen (b)	R ²
Mirtazapina	22803	831	0,999
Venlafaxina	50097	123	0,999
Escitalopram	26052	-276	0,999
Fluvoxamina	5717	50	0,998
Fluoxetina	9011	-239	0,999
Sertralina	12376	-87	0,998

4.5.2.1.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) obtenidos se muestran en la **Tabla 4.27**. Los límites de detección oscilan entre 4 ng/mL (mirtazapina, venlafaxina y sertralina) y 5 ng/mL (escitalopram, fluvoxamina y fluoxetina). Los límites de cuantificación varían entre 12 ng/mL (mirtazapina) y 17 ng/mL (escitalopram, fluvoxamina y fluoxetina). Los resultados obtenidos son adecuados para los objetivos propuestos y son similares o menores que los reportados por otros autores (**Tournel y col, 2001; Frahnert y col, 2003; Sabbioni y col, 2004; Greiner y col, 2007; Sempio y col, 2014**).

Tabla 4.27. Límites de detección y cuantificación de los antidepresivos

	Mirtazapina	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Fluoxetina	Sertralina
LOD (ng/mL)	4	4	5	5	5	4
LOQ (ng/mL)	12	13	17	17	17	13

4.5.2.1.3 Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico de distinguir y cuantificar el analito en presencia de otros

componentes de la muestra. La aplicación del proceso de extracción a muestras de plasma libre de drogas demuestra la ausencia de compuestos interferentes en las regiones cromatográficas de los analitos estudiados, poniéndose de manifiesto por tanto una excelente selectividad, como se aprecia en la **Figura 4.37**.

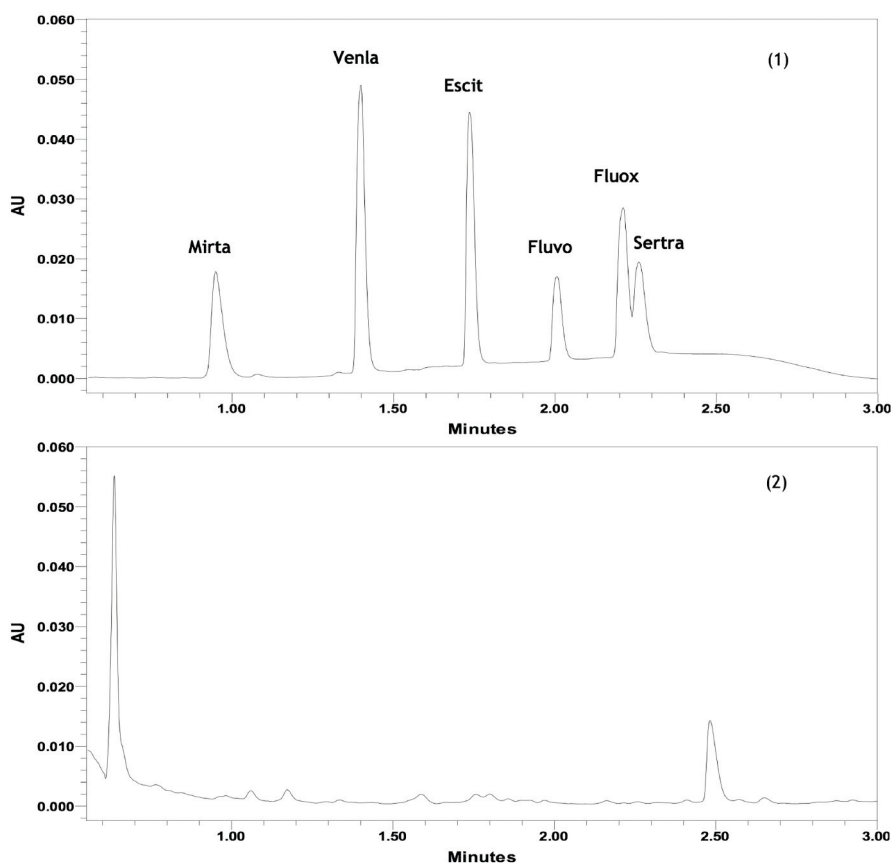


Figura 4.37: Dos cromatogramas UPLC-PDA: (1) Plasma con los antidepresivos (1 $\mu\text{g/mL}$) y (2) Plasma blanco.

(1)

4.5.2.1.4 Precisión, Exactitud y Recuperación

La *precisión* se calculó en términos de %RSD (desviación standard relativa) ó %CV (coeficiente de variación), para tres niveles de concentración (0,02; 0,2 y 2 µg/mL), a partir de una recta de calibrado de adición inyectada el mismo día que los tres niveles de control (n=5) para el estudio intra-día, y a partir de rectas de calibrado inyectadas en 5 días diferentes para el estudio inter-día. Los resultados de las desviaciones estándar relativas (**Tabla 4.28, Figuras 4.38 y 4.39**) son satisfactorios, ya que están comprendidos entre un 1,8% y un 7,5% para los ensayos intra-día y entre un 2,7% y un 8,0% para los ensayos inter-día. Estos valores son menores que los reportados por **Rodríguez Chaves y col (2009-UV)**, **Bahrami y col (2009-FLD)**, **He y col (2005-MS)**, **Amundsen y col (2013-MS)** y **Bazregar y col (2016-MS)**, que usaron cromatografía líquida acoplada a diferentes detectores: ultravioleta (UV), fluorescencia (FLD) y espectrometría de masas (MS).

Tabla 4.28. Precisión intra-día e inter-día para los antidepresivos (N=5)

ANTIDEPRESIVO	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	INTRA-DÍA (% CV)	INTER-DÍA (% CV)
Mirtazapina	0,02	6,5	6,9
	0,2	4,0	7,3
	2,0	2,7	5,1
Venlafaxina	0,02	6,7	6,2
	0,2	5,3	4,1
	2,0	2,4	5,5
Escitalopram	0,02	7,5	7,7
	0,2	7,4	7,6
	2,0	1,8	2,7
Fluvoxamina	0,02	6,9	8,0
	0,2	6,7	7,5
	2,0	2,5	5,1

Fluoxetina	0,02	3,9	7,6
	0,2	4,8	7,8
	2,0	2,0	3,6
Sertralina	0,02	7,5	5,5
	0,2	6,2	6,9
	2,0	1,9	5,1

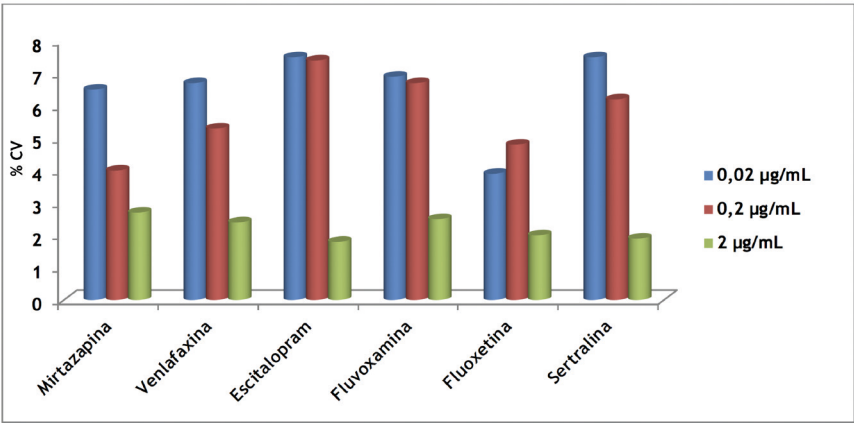


Figura 4.38. Precisión intra-día (repetibilidad) a 3 niveles de concentración (N=5)

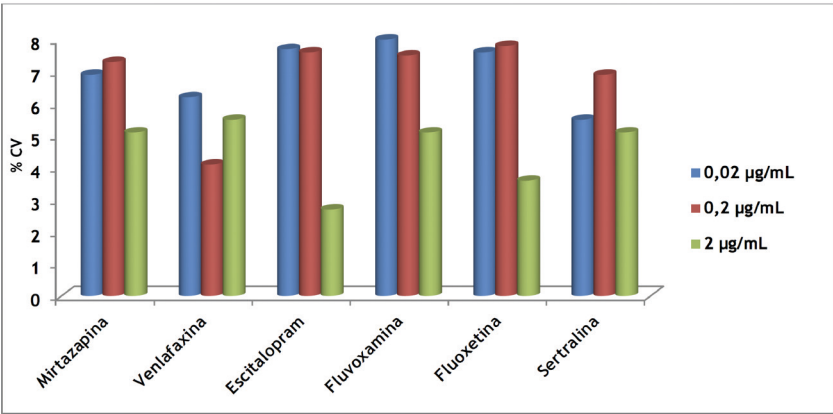


Figura 4.39. Precisión inter-día (reproducibilidad) a 3 niveles de concentración (N=5)

La *exactitud* fue calculada en términos de % recuperación, usando el método propuesto (UA-DLLME/UPLC-PDA), a tres niveles de concentración (0,2; 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$), para cada antidepresivo (**Tabla 4.29 y Figura 4.40**). La relación entre la fracción recuperada y la real se denomina porcentaje de recuperación, y los valores obtenidos se consideran adecuados porque oscilan entre un 96% y un 109% para la concentración baja, entre un 94% y un 102% para la concentración intermedia, y entre un 93% y un 109% para la concentración alta. Los resultados fueron similares o mayores que los obtenidos por otros autores, que usaron extracción líquido-líquido (**Vlase y col, 2005; Bahrami y col, 2009**) o extracción en fase sólida (**Saracino y col, 2006; De Castro y col, 2008**). Sin embargo, en los últimos años se han publicado recuperaciones superiores para algún antidepresivo de los estudiados en esta tesis doctoral. Así, **Unceta y col (2010), Ghambarian y col (2012), Amundsen y col (2013) y Lin y col (2016)** reportan valores de 87-110%, 88-109%, 82-100% y 79-106%, respectivamente, después de utilizar diversos procedimientos de extracción (**Tabla 4.30**).

Tabla 4.29. Recuperación de los antidepresivos a tres niveles de concentración (N=5)

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (% \pm SD)	Recuperación Media (% \pm SD)
Mirtazapina	0,2	110 (8,6)	107 (7,3)
	1	102 (6,2)	
	2	109 (7,0)	
Venlafaxina	0,2	106 (8,2)	102 (5,7)
	1	97 (4,1)	
	2	103 (4,7)	
Escitalopram	0,2	109 (8,1)	103 (4,7)
	1	100 (2,8)	
	2	101 (3,2)	
Fluvoxamina	0,2	96 (8,0)	96 (7,1)
	1	96 (5,5)	
	2	96 (7,9)	

Fluoxetina	0,2	102 (6,0)	96 (4,7)
	1	94 (4,6)	
	2	93 (5,4)	
Sertralina	0,2	103 (4,2)	97 (5,9)
	1	95 (7,6)	
	2	94 (5,9)	

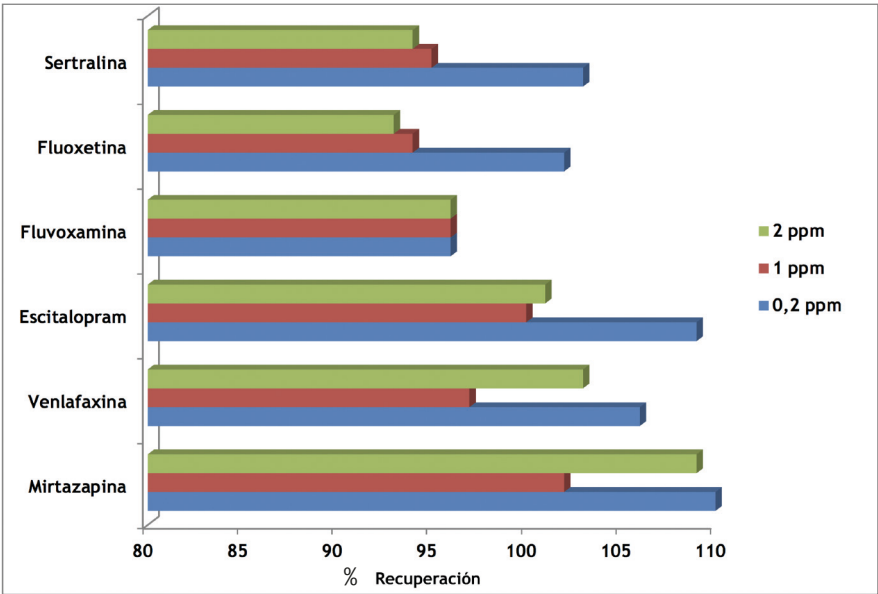


Figura 4.40. Recuperación de los antidepresivos a 3 niveles de concentración (N=5)

Tabla 4.30. Otros métodos de cromatografía líquida para el estudio de antidepresivos en sangre y derivados (algunos son estudios con HPLC)

Referencia	Muestra	Método	Rango lineal (ng/mL)	LOD / LOQ (ng/mL)	Precisión (%)	Recuperación (%)	Analito
Tournel, 2001	Suero	LLE / UV	15-1000	ND / 15-50	0,8-8,1		Fluvoxamina Fluoxetina Sertralina Citalopram Venlafaxina
Labat, 2002	Sangre	LLE / DAD	30-2000	10-20 / 20-30	1,8-6,8		Venlafaxina Fluvoxamina Sertralina Fluoxetina Citalopram
Frahnert, 2003	Suero	SPE / UV	5-500	1,1-10,2	0,9-10,2	75-99	18 ATDs
Llerena, 2003	Plasma	LLE / UV	100-1600 nmol/L	10 / 100 nmol/L	0,7-8,1	86,1-92,7	Fluoxetina Norfluoxetina
Sabbioni, 2004	Plasma	SPE / DAD	150-3000	15-30 / 150	1,9-3,2	93-101	Fluoxetina Norfluoxetina
Li, 2004	Suero	LLE / FLD	10-4000 nmol/L	ND / 10nmol/L	2,12-12,9	95,5-96,9	Fluoxetina Norfluoxetina
Juan, 2005	Plasma	SPE / MS	5-1000	0,1-0,5 / 5	7-14	73-96	Fluoxetina Venlafaxina
Kirchherr, 2006	Suero	Pptación prot / MS-MS	5-1000	0,70-2,17 / 5	5,1-8,2	95-103	18 ATDs
Saracino, 2006	Plasma	SPE / UV	5-160	1,7 / 5	2,3-4,0	93-98	Fluvoxamina
Malfará, 2007	Plasma	LLE / UV	5-2000	ND / 5-10	<10	72-86	10 ATDs
Greiner, 2007	Suero	CS / DAD	12,5-200	6,25 / 12,5	0,2-9,1	64-84	Citalopram Norcitalopram
Esrafil, 2007	Plasma	HF-LPME / UV	5-500	0,5-0,7 / 1,7-2,3	2-12	65-68	Amitriptilina Imipramina Sertralina
De Castro, 2008	Plasma	SPE / MS-MS	2-1000	ND / 2-10	1,4-8,0	49-72	9 ATDs

Gonçalves Silva, 2008	Plasma	SPME / UV	40-500	5-20 / 20-50	1,09-7,80	95,5-102,8	Citalopram Sertralina Fluoxetina
Qin, 2008	Plasma	CPE / FLD	10-800	< 2 / < 10	0,6-9,6	93-96	Venlafaxina
Saber, 2009	Plasma	SPE / MS	5-60	3,0 / 5,0	6,6-11,0	99-105	Fluoxetina
Rodrigues Chaves, 2010	Plasma	MEPS / UV	10-1000	ND / 10-25	1,3-8,7	84-97	Mirtazapina Citalopram Sertralina
Zheng, 2010	Plasma	SPME / MS	1-500	0,06-2,95	<16,5	75-113	Citalopram Fluoxetina Sertralina
Unceta, 2010	Plasma	SBSE / FLD	0,2-2000	ND / 0,2-2,0	3,5-12,6	90-110	Fluoxetina Citalopram Venlafaxina
Rani, 2011	Plasma	MEPS / UV	5-500	0,13-0,36/ 0,34-0,93	1,7-3,2	66-98	Mirtazapina Citalopram
Ghambarian, 2012	Plasma	HF-LLLME / DAD	0,2-200	0,08-0,20 / ND	3,5-7,2	88-109	ATDs
Amundsen, 2013	Sangre	LLE / MS-MS	7,6-3300	0,7-1,1 / 3,2-7,6	2,6-15	82-100	Citalopram Sertralina Venlafaxina
Dutta, 2013	Plasma	SPE / MS-MS	0,6-300	ND / 0,6	1,2-11,8	79-88	Venlafaxina y metabolitos
Sempio, 2014	Sangre	Pptación prot / MS-MS	50-1000	1-6,1 / 3,2-20	< 15		ATDs y metabolitos
Montenarh, 2014	Plasma Sangre Suero	LLE / MS-MS	200-800 100-600 20-150 5-800	0,0025-0,15/ 0,005-0,10	< 14	85-123	Fluoxetina Fluvoxamina Sertralina Venlafaxina
De Souza, 2015	Plasma	MEPS / MS-MS	50-850 5-325	0,05 / 5,0	3,6-10,4		Fluoxetina Sertralina
Asgharinezhad, 2015	Plasma	Dispersive- μ SPE / UV	1-800 μ g/L	0,2-1,0 / 1,0	4,3-9,2	93-99	Sertralina Citalopram
Soares Domingues, 2015	Plasma	Pptación prot / MS-MS	2,5-1050	0,2-5,0 / 5,0	< 12	90-108	Citalopram Fluoxetina Mirtazapina Sertralina
Miranda, 2016	Plasma	MISPE / MS-MS	3-700	ND / 3-5	< 13	67-84	Venlafaxina y metabolitos

Lin, 2016	Plasma	DLLME / CE	0,0050-0,50 nmol/L	1,4-1,7 / ND	2,9-5,0	79-106	Citalopram Fluoxetina Fluvoxamina
Weisskopf, 2016	Plasma	Pptación prot+SPE / MS-MS	0,1-100	ND / 0,1	0,9-15,9	90-113	Citalopram
Chen, 2017	Plasma	UA-LDS-DLLME / GC-MS	5-1500	ND / 5-15	1,0-9,5	51-99	12 ATDs
Rosado, 2017	Plasma	SPE / GC-MS	2-640	1-5 / 1-15	2,3-14,5	68-98	11 ATDs
Pouliopoulos, 2018	Suero, Sangre	QuEChERS / MS-MS	0,001- 6,0	0,3-3,0 / 1,0-10,0	1,2-10,5	72,3-91,3	Mirtazapina Venlafaxina Citalopram Fluoxetina Sertralina
Steuer, 2018	Sangre	Pptación prot / MS-MS	6-1500	0,2-0,8 / ND	1,5-15,3	52,5-100,3	Citalopram Fluoxetina Mirtazapina Sertralina Venlafaxina

*ATDs: antidepresivos; CE: capilar electrophoresis; CPE: cloud-point extraction; CS: column switching; HF-LLLME: three-phase hollow fiber-microextraction; LLE: liquid-liquid extraction; MISPE: miniaturized molecularly imprinted solid-phase extraction; ND: not described; QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe); SBSE: stir bar sorptive extraction; SPE: solid-phase extraction; UA-LDS-DLLME: ultrasound-assisted-low-density solvent-dispersive liquid-liquid microextraction

4.5.2.1.5 Aplicación del método a casos reales de intoxicación

Una vez que el método analítico fue validado, éste se aplicó a 24 muestras de plasma procedentes de sujetos intoxicados o a tratamiento con antidepresivos, usando DLLME-HPLC/PDA. En la **Tabla 4.31** se observa que 16 de los sujetos estudiados consumieron además otras sustancias, tales como benzodiacepinas (8 casos), analgésicos (6 casos), drogas de abuso (4 casos), otros antidepresivos (4 casos) o alcohol (2 casos). En nueve individuos se detectó la presencia de tres o más sustancias activas, que pueden sumar o incluso potenciar los efectos del antidepresivo; los casos 2, 5, 16 y 19 han dado positivo a opiáceos y/o cocaína, por lo que se consideran cócteles peligrosos y posibles inductores de muerte.

Tabla 4.31. Concentraciones plasmáticas de los antidepresivos en 24 casos de intoxicación

CASOS	ANALITO	CONCENTRACIÓN (ng/ML)	OTRAS DROGAS
1	Fluvoxamina	28	Paracetamol, Ibuprofeno, Clomipramina
2	Escitalopram	40	Codeína, Morfina, THC, Metamizol, Ibuprofeno
	Fluoxetina	24	
3	Venlafaxina	564	Ibuprofeno, Metamizol
4	Venlafaxina	182	Varias Benzodiazepinas
5	Venlafaxina	45	Cocaína, Morfina, Salicilatos
6	Venlafaxina	1060 (tóx)	Alprazolam, Naproxeno, Ibuprofeno
7	Fluoxetina	170	Varias Benzodiazepinas
8	Venlafaxina	1075 (tóx)	Imipramina
9	Venlafaxina	49	---
10	Venlafaxina	407	Imipramina
11	Venlafaxina	43	Alcohol
12	Venlafaxina	284	---
13	Venlafaxina	311	---
14	Venlafaxina	41	Varias Benzodiazepinas
15	Venlafaxina	80	---
16	Venlafaxina	180	Cocaína, Oxazepam, Nordiazepam
17	Venlafaxina	140	Alprazolam
18	Fluoxetina	510	Citalopram, Clonazepam
19	Venlafaxina	250	Alprazolam, Lorazepam, Tramadol, Metamizol
20	Sertralina	300	---
21	Venlafaxina	260	---
22	Venlafaxina	300	Alcohol
23	Escitalopram	130	---
24	Venlafaxina	580	---

Como se puede apreciar en la **Figura 4.41**, un 75% de los sujetos habían consumido venlafaxina, un 12,5% fluoxetina, un 8,3% escitalopram, un 4,2% fluvoxamina y un 4,2% sertralina. En la **Figura 4.42** se muestra un cromatograma del caso real número 4 de la Tabla 4.31, en el que se ha aplicado el procedimiento optimizado.

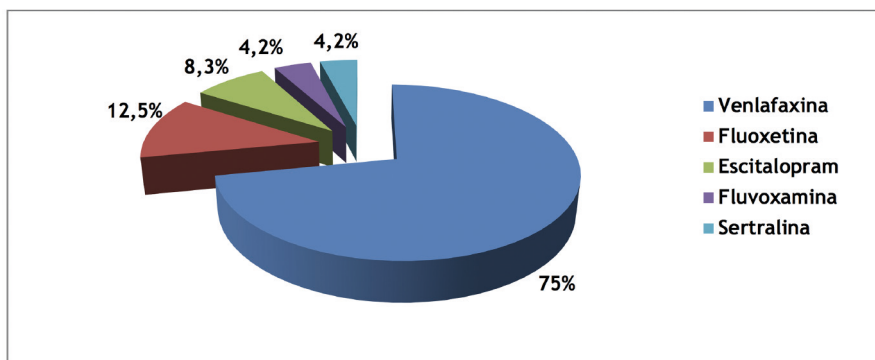


Figura 4.41. Porcentaje de casos positivos de antidepresivos en las muestras analizadas

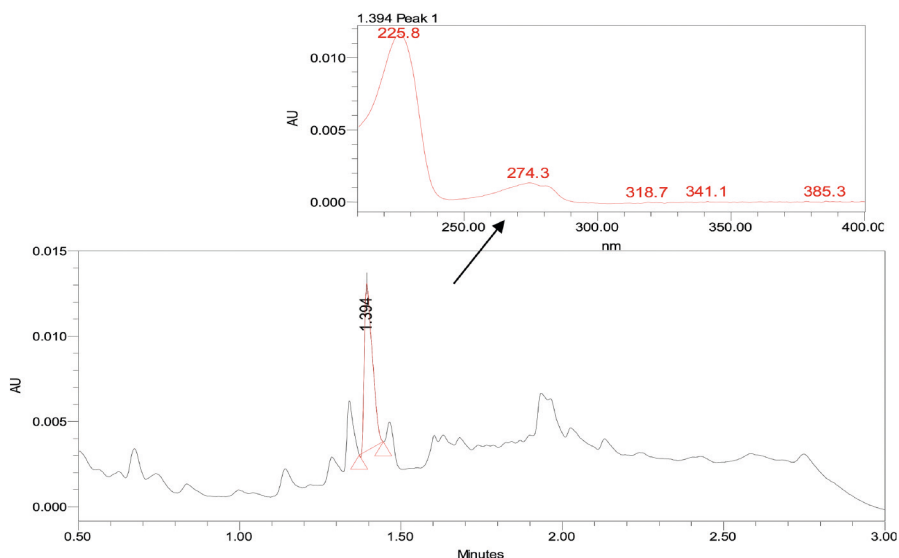


Figura 4.42. Cromatograma correspondiente al caso real número 4 (UPLC-PDA)
[Venlafaxina]: 182 ng/mL)

Según la **Tabla 4.32** los niveles plasmáticos de los antidepresivos estudiados fueron tóxicos, en dos casos (**Moffat y col, 2004**), y resultaron ser similares a los reportados por **Lacassie y col (2000)** y **Saracino y col (2006)** para fluoxetina y fluvoxamina, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados fueron mucho menores que los publicados por **Labat y col (2002)** y **Sempio y col (2014)** para venlafaxina, y por **Sabbioni y col (2004)** para fluoxetina. Por último, también se deben destacar algunas publicaciones en las cuales los niveles de antidepresivos son muy inferiores a los encontrados en este trabajo para el escitalopram (**Greiner y col, 2007**), para la fluoxetina (**Vlase y col, 2005**; **Saber y col, 2009**) o para la sertralina (**De Castro y col, 2008**) (**Tabla 4.33**).

TABLA 4.32 Niveles terapéuticos y tóxicos en muestras de plasma.

Compuesto	Conc. terap. (ng/mL)	Conc. tóxica (µg/mL)
Mirtazapina	250-750	1
Venlafaxina	20-100	7,27
Escitalopram	20-200	0,5b
Fluvoxamina	50-250	-
Fluoxetina	150-500	1,3-6,8
Sertralina	50-250	No reportado

Tabla 4.33. Revisión bibliográfica: concentraciones plasmáticas medias en intoxicaciones por antidepresivos (ng/mL)

	Venlafaxina	Escitalopram	Fluvoxamina	Fluoxetina	Sertralina
Labat, 2002 (1 caso)	4.900 (tóx)				
Llerena, 2003 (29 casos)				136,1	
Sabbioni, 2004 (1 caso)				1.140 (tóx)	

Vlase, 2005 (1 caso)				5,2	
Juan, 2005 (3 casos)	228,4			41,4	
Saracino, 2006 (1 caso)			26,1		
Greiner, 2007 (1 caso)		14			
Malfará, 2007 (20 casos)				49,8	
Rodrigues Chaves, 2007 (1 caso)		61,2			
Gonçalves Silva, 2008 (2 casos)				314	445
De Castro, 2008 (12 casos)	173,4	67,4		73,6	35,1
Saber, 2009				9	
Remane, 2011 (1 caso)	404				
Sempio, 2014 (6 casos)	21.496 (tóx)			260	751
De Souza, 2015 (5 casos)		93,7		138	18
Hamedi, 2016 (1 caso)				57	
Lemos Pinto, 2017 (3 casos)					78
Chen, 2017 (1caso)		105,2			
Pouliopoulos, 2018 (3 casos)		258			692
ESTE TRABAJO	325	85	28	235	300

4.5.2.2 Validación del Método Analítico (UPLC-MS/MS)

El equipo utilizado para el análisis de seis antidepresivos, incluida la mirtazapina, es un cromatógrafo de líquidos de ultra resolución con detección de masas en tándem. Las condiciones experimentales del cromatógrafo que se usan se muestran en la **Tabla 4.34**.

Tabla 4.34. Condiciones experimentales del método UPLC-MS/MS

Equipo	UPLC-MS/MS Xevo™ TQ-S
Modo ionización	ESI positivo
Modo de trabajo	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Columna	Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)
Voltaje de capilar	0,8 KV
Temperatura gas de secado (N ₂)	450°C
Flujo gas de secado (N ₂)	800 L/hora
Flujo gas de nebulización (N ₂)	20 L/hora
Presión gas de nebulización (N ₂)	7 bar
Flujo gas de colisión (Ar)	0,15 mL/min
Temperatura fuente de ionización	100°C
Tiempo de barrido	0,005 s

El gradiente utilizado para la separación cromatográfica de los antidepresivos se muestra en la **Tabla 4.35**. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C, el volumen de inyección se fijó en 5 µL y el flujo de la fase móvil en 0,5 mL/min.

Tabla 4.35. Gradiente seleccionado para la separación cromatográfica.

Tiempo (min)	%A	%B
0,0	85	15
0,6	85	15
2,0	60	40
3,0	85	15
4,0	85	15

A: Agua ultrapura con 0,1% de ácido fórmico

B: Acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico

En la **Tabla 4.36** se muestra el tiempo de retención de los analitos y las transiciones MRM de cuantificación y de cualificación (relación m/z del ion precursor \rightarrow relación m/z del ion producto), además del voltaje del capilar y las energías de colisión optimizados para cada transición.

Tabla 4.36. Condiciones de UPLC- MS/MS optimizadas para los antidepresivos estudiados

Analito	t_r (min)	MRM 1 (Cuantificador)	Voltaje de capilar (V)	CE (eV)	MRM 2 (Cualificador)	CE (eV)
Mirtazapina	0,88	266,06 \rightarrow 195,04	48	18	266,06 \rightarrow 71,95	18
Venlafaxina	2,01	278,11 \rightarrow 260,18	30	16	278,11 \rightarrow 57,96	10
Escitalopram	2,49	325,07 \rightarrow 262,09	40	24	325,07 \rightarrow 109,02	18
Fluvoxamina	2,72	319,25 \rightarrow 71,04	30	24	319,25 \rightarrow 44,95	10
Fluoxetina	2,85	310,10 \rightarrow 148,08	30	10	310,10 \rightarrow 43,91	8
Sertralina	2,90	306,11 \rightarrow 275,05	28	24	306,11 \rightarrow 158,93	10

t_r tiempo de retención; CE energía de colisión

El cromatógrafo UPLC® está acoplado a un detector Waters Xevo TQ-S que opera en modo positivo a presión atmosférica de ionización por electrospray (ESI). La ionización se estudió en modo positivo. La detección se basa en la masa molecular del analito, junto con el modelo de desintegración inducida por la colisión de sus iones con un gas inerte (argón). Este es el fundamento de “Multiple Reaction Monitoring” (MRM) que produce una alta especificidad para la detección del analito, basada en la transición de masas, y además la señal de fondo se elimina casi completamente, lo que permite ensayos muy sensibles con alta relación señal/ruido. La adición de isótopos marcados a los analitos de interés (patrones deuterados) permite la utilización del método de patrón interno en la calibración.

Se ha seguido la Directiva 2002/657/CE, que se refiere al análisis de residuos en alimentos pero que es aceptada en otros campos de análisis, según la cual se requieren dos transiciones distintas para confirmar la identidad de un compuesto. Las transiciones de cuantificación (MRM 1) y de confirmación (MRM 2), así como los voltajes óptimos del capilar y las energías de colisión (CE) correspondientes, se muestran en la **Tabla 4.36**. El estudio se

llevó a cabo mediante la infusión a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, de patrones individuales de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparados en metanol. Se utilizan unas condiciones generales de desolvatación o secado de 200°C con un flujo de 650 L/h.

Se optimizaron los siguientes parámetros de MS: voltaje del capilar, temperatura de secado o desolvatación, flujo del gas (N_2) de secado o desolvatación, flujo del gas (N_2) de nebulización y temperatura de la fuente de ionización. En todos los casos se realizaron 6 experimentos. En primer lugar se optimizó el voltaje del capilar para cada voltaje, con el fin de obtener la señal máxima del ion precursor que correspondería al ion molecular protonado (ESI^+), como se ve en la **Figura 4.43**. La mayoría de los compuestos presentaron mayor respuesta con un voltaje de capilar de 0,6 kV, pero se tomó un voltaje óptimo de 0,8 KV por ser determinante su valor en la respuesta de la mirtazapina.

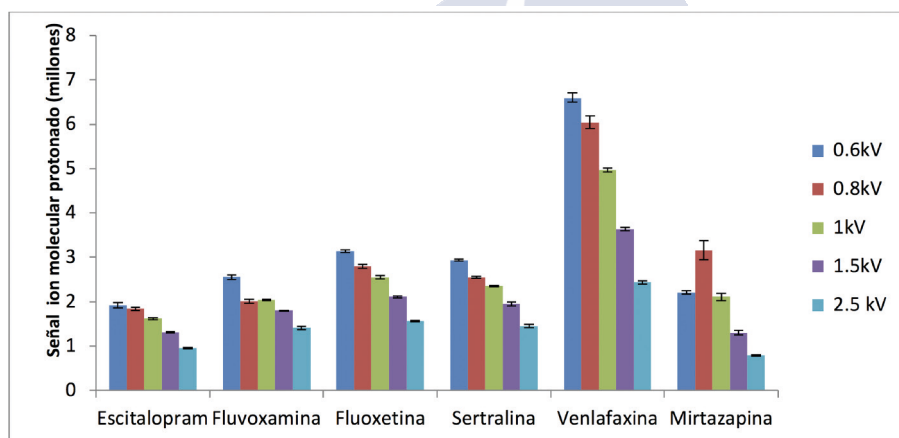


Figura 4.43. Optimización del voltaje del capilar en ESI^+ para los antidepresivos estudiados (N=3)

A continuación se optimizó la temperatura del gas de desolvatación o secado, como se muestra en la **Figura 4.44**. La mayoría de los compuestos presentaron mayor respuesta al aumentar la temperatura del gas de desolvatación o secado. Se fijó una temperatura óptima de 450°C por presentar baja variabilidad en las pruebas realizadas y proporcionar una respuesta suficientemente alta para todos los antidepresivos.

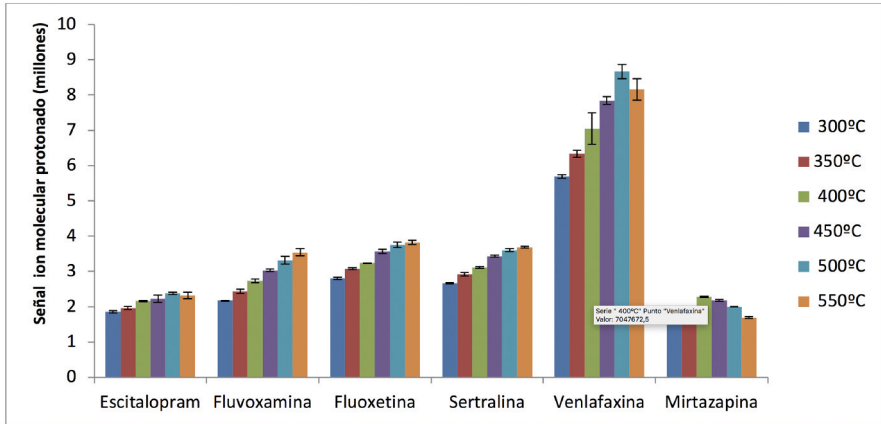


Figura 4.44. Optimización de la temperatura de desolvatación para los antidepresivos (N=3)

También se evaluó el flujo de gas de desolvatación (N_2), como muestra la **Figura 4.45**. No se observaron diferencias significativas al variar el flujo de gas de secado, por ello se seleccionó un valor intermedio de 800 L/h, que proporcionaba buenos resultados y baja variabilidad en la respuesta.

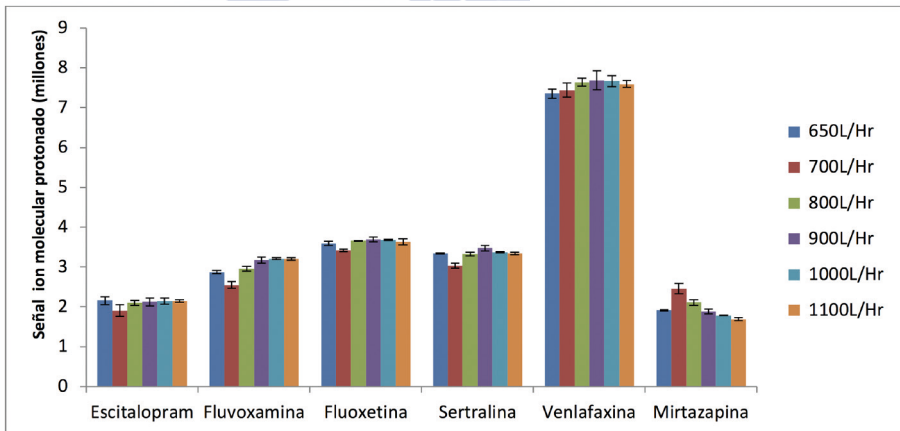


Figura 4.45. Optimización del flujo de gas de desolvatación para los antidepresivos estudiados (N=3)

El siguiente parámetro estudiado fue el flujo de gas de nebulización y los resultados se presentan en la **Figura 4.46**. El valor seleccionado y que proporcionaba una buena respuesta y baja variabilidad de todos los compuestos fue 20 L/h.

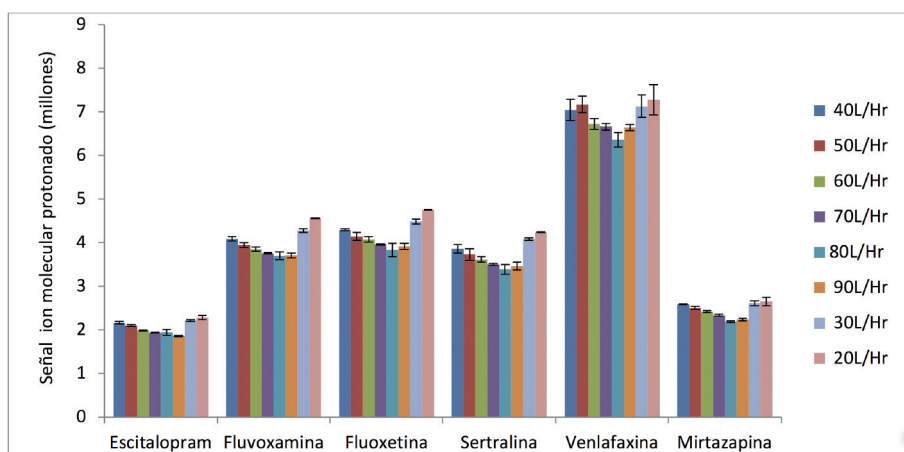


Figura 4.46. Optimización del flujo de gas de nebulización para los antidepresivos estudiados (N=3)

Finalmente, se optimizó la temperatura de la fuente de ionización, según la **Figura 4.47**. La temperatura que proporciona una mejor respuesta de todos los compuestos fue 100°C.

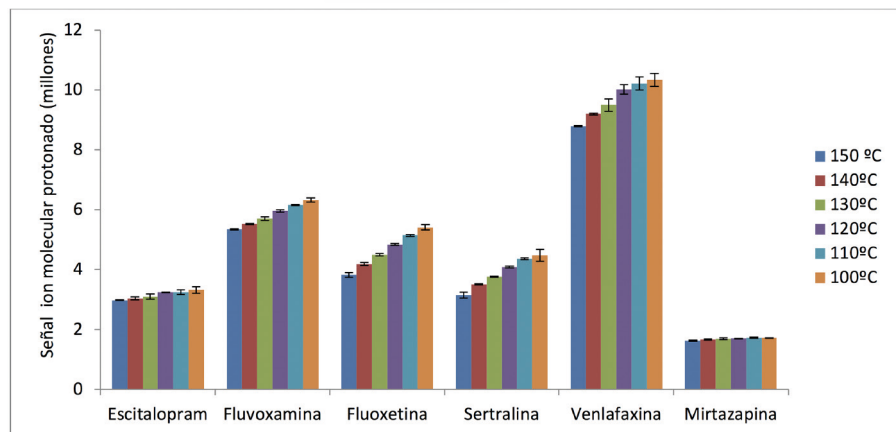


Figura 4.47. Optimización de la temperatura de la fuente de ionización para los antidepresivos estudiados (N=3)

La separación e identificación de los seis antidepresivos estudiados se realizó en función de sus tiempos de retención y sus iones de cuantificación y confirmación, mediante UPLC-MS/MS.

En este tipo de equipos se usa un analizador de triple cuadrupolo (MS/MS) con una configuración secuencial, de forma que el primero y último (Q1 y Q3) actúan como cuadrupolos normales, mientras que el segundo actúa como celda de colisión. Los iones que entran en esta celda colisionan entre ellos fragmentándose. Los iones formados pasan al Q3 para ser finalmente analizados. Con este tipo de detectores se consigue una disminución del ruido de fondo, lo que se traduce en un aumento de la sensibilidad.

A continuación, la **Figura 4.48**, muestra los cromatogramas de cada uno de los patrones de antidepresivos de 10 ng/mL y los patrones deuterados, utilizando las transiciones MRM que aparecen a la derecha de la figura, en cada caso.

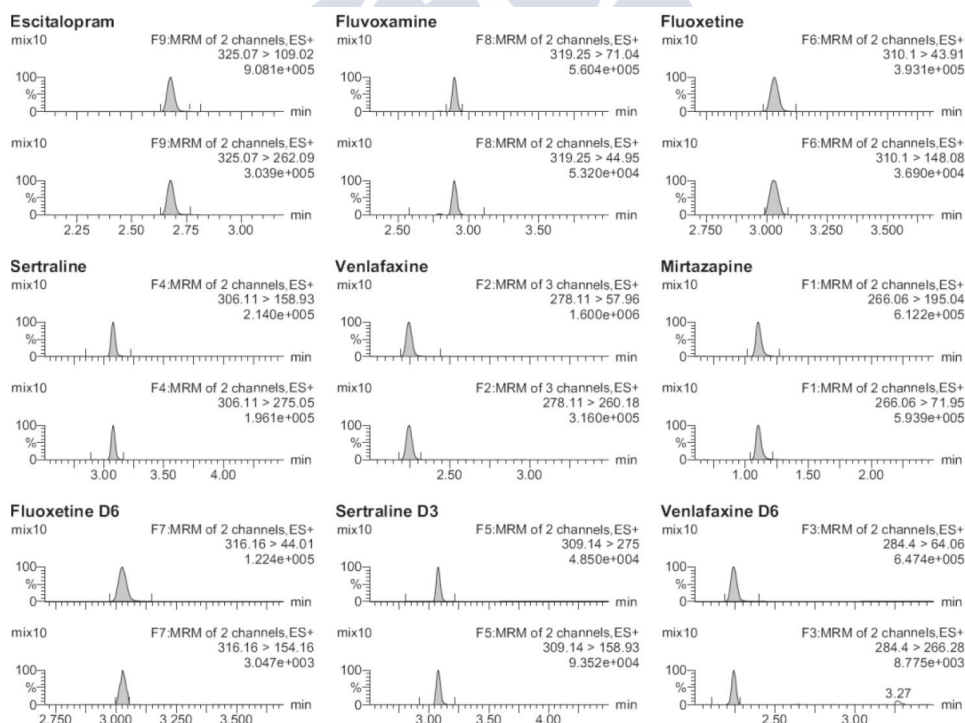


Figura 4.48. Cromatogramas individuales de cada patrón de antidepresivos

Los métodos cuantitativos de análisis de drogas y compuestos psicoactivos, como los antidepresivos, exigen que se determinen una serie de parámetros:

- Linealidad
- Límite de detección
- Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio)
- Exactitud (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio)
- Recuperación

4.5.2.2.1 Linealidad

Para estudiar la linealidad del método se inyectaron disoluciones patrón que contenían todos los antidepresivos en concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 50; 100 y 250 ng/mL y los patrones internos Fluoxetina-D6, Sertralina-D6 y Venlafaxina-D6 de 10 ng/mL. En el caso de Venlafaxina y Fluvoxamina, el primer nivel del calibrado fue 0,25 ng/mL. Se elaboraron rectas de calibrado para cada analito mediante el método de patrón interno con los patrones deuterados, en fase móvil, inyectando tres réplicas de cada uno de los ocho niveles de concentración considerados (**Tabla 4.37**). Los datos obtenidos permiten la obtención de la ecuación de la recta de regresión para cada analito ajustándose a un modelo lineal del tipo $y = ax + b$, donde “a” es la pendiente y “b” la ordenada en el origen. A partir de la ecuación de la recta se calcula el coeficiente de determinación, R^2 .

Además, se aplicó el método de calibración Matrix-Matched (**Tabla 4.38**), que se basa en utilizar, como patrones de calibrado, extractos de plasma blanco (sin los analitos de interés) obtenidos con la técnica de extracción aplicada en este trabajo (DLLME) y a los que se les adicionan concentraciones de patrones y patrones deuterados, en el mismo rango que en el calibrado descrito anteriormente. Con este calibrado se evaluó el efecto matriz.

Tabla 4.37. Parámetros de regresión en el calibrado en fase móvil mediante UPLC-MS/MS

Compuesto	Ordenada en el origen	Pendiente	R ²
Sertralina	-0,0889	4,1451	0,9972
Venlafaxina	0,1227	1,0957	0,9991
Mirtazapina	0,0964	0,4024	0,9953
Fluoxetina	-0,1031	2,8091	0,9989
Fluvoxamina	-1,1852	2,6238	0,9983
Escitalopram	0,2798	4,6971	0,9994

Tabla 4.38. Parámetros de regresión por el método Matrix-Matched mediante UPLC-MS/MS

Compuesto	Ordenada en el origen	Pendiente	R ²
Sertralina	-0,7874	4,6098	0,9968
Venlafaxina	0,2650	1,4363	0,9985
Mirtazapina	0,2679	1,2408	0,9982
Fluoxetina	0,1269	2,3239	0,9982
Fluvoxamina	0,3173	1,8626	0,9991
Escitalopram	2,0121	4,6567	0,9971

A continuación, en las **Figuras 4.49 y 4.50** se muestran las rectas de calibrado obtenidas para venlafaxina y escitalopram, respectivamente, a modo de ejemplo:

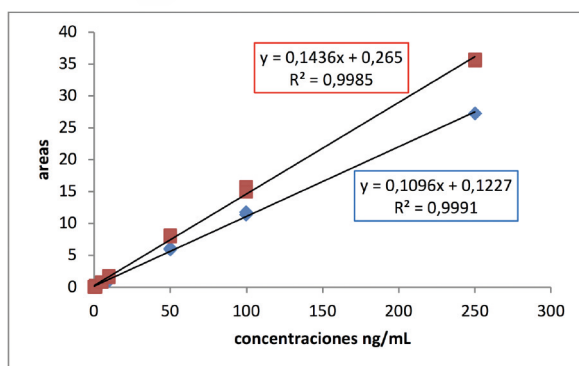


Figura 4.49. Recta de calibrado en fase móvil (azul) y matrix-matched (rojo) para venlafaxina

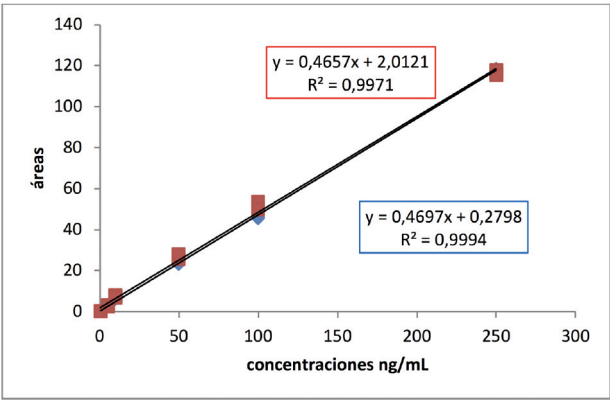


Figura 4.50. Recta de calibrado en fase móvil (azul) y matrix-matched (rojo) para escitalopram

Para evaluar el efecto matriz se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{|\text{pendiente calibrado MM} - \text{pendiente calibrado FM}|}{\text{pendiente calibrado FM}} \times 100$$

Se considera que existe efecto matriz cuando se obtiene un valor superior al 10%.

Como se observa en la **Tabla 4.39**, el escitalopram es el único antidepresivo que no presenta efecto matriz, siendo la mirtazapina la que posee este efecto de manera más acusada. La fluoxetina y la fluvoxamina presentan un efecto de supresión de señal mientras que para la sertralina, la venlafaxina y la mirtazapina, la matriz induce aumento de señal.

Tabla 4.39. Efecto matriz para cada antidepresivo

Sertralina	Venlafaxina	Mirtazapina	Fluoxetina	Fluvoxamina	Escitalopram
+11,2	+31,1	+208,3	-20,8	-40,8	-0,9

4.5.2.2.2 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) se define como la cantidad más pequeña de analito que puede detectarse en una muestra con una

certeza razonable mediante un proceso analítico. El límite de detección se calcula analizando n replicados de plasma blanco y aplicando la siguiente ecuación considerando señales 3 veces superiores a la señal ruido.

$$Y_{\text{LOD}} = \bar{Y}_B + 3S_B$$

donde \bar{Y}_B representa la señal media del ruido o del blanco y S_B la desviación estándar correspondiente. La concentración del límite de detección (X_{LOD}) se obtiene sustituyendo la señal Y_{LOD} en la recta de calibrado.

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la mínima cantidad de analito inyectada que puede dar medidas cuantitativas precisas. La señal del límite de cuantificación se considera 10 veces superior a la que presenta el nivel de ruido de la línea de base. Se calcula usando la siguiente ecuación (Miller y Miller, 2002):

$$Y_{\text{LOQ}} = \bar{Y} + 10S_B$$

En la **Tabla 4.40** se muestran los límites de detección y cuantificación obtenidos para los antidepresivos estudiados.

Tabla 4.40. Límites de detección y cuantificación de los antidepresivos (ng/mL)

Ref.	Sertralina	Venlafaxina	Mirtazapina	Fluoxetina	Fluvoxamina	Escitalopram	
Este trabajo	0,01	0,1	0,01	0,01	0,1	0,01	LOD
Este trabajo	0,1	0,25	0,1	0,1	0,25	0,1	LOQ
Monte narh, 2014	0,001	0,0025	0,01	0,15	0,05	0,01	LOD
Monte Narh, 2014	0,02	0,005	0,02	0,2	0,1	0,02	LOQ

4.5.2.2.3 Precisión, Exactitud y Recuperación

La *precisión* mide la variabilidad de los resultados obtenidos cuando una muestra se analiza repetidas veces. Una forma de evaluar la precisión es a través de la *repetibilidad* que mide la variabilidad de los resultados en las mismas condiciones, y la *precisión intermedia* que mide la variabilidad de los resultados en diferentes condiciones (Harvey, 2002).

Los resultados se expresan por medio del coeficiente de variación, que mide el grado de proximidad de los datos en torno al valor de la media, dado en porcentaje. La forma de calcularlo es la siguiente:

$$\%CV = \frac{s}{x} 100$$

donde “x” es la media y “s” es la desviación estándar.

Los ensayos intra-día e inter-día se han realizado a tres niveles de concentración: 0,5, 5 y 100 ng/mL, como se muestra en la **Tabla 4.41**.

Tabla 4.41: Coeficientes de variación intradía e interdía.

	Concentración (ng·mL ⁻¹)	Precisión Intra-día (%)	Precisión Inter-día (%)
Escitalopram	0,5	8,3	14,5
	5	12,8	7,1
	100	7,5	13,0
Fluvoxamina	0,5	10,1	14,8
	5	10,9	12,7
	100	13,1	11,6
Fluoxetina	0,5	12,6	13,7
	5	3,0	13,0
	100	11,2	11,2

Sertralina	0,5	7,6	12,6
	5	6,7	12,6
	100	5,7	6,6
Venlafaxina	0,5	9,3	12,7
	5	6,1	6,0
	100	9,6	8,7
Mirtazapina	0,5	5,0	14,8
	5	3,5	11,9
	100	5,3	7,6

La *exactitud* es una medida de la proximidad existente entre el valor experimental y el valor de referencia aceptado. Los errores que afectan a la exactitud se denominan errores sistemáticos y la determinación de este parámetro permite conocer el grado en el que los errores sistemáticos afectan a un método analítico (Harvey, 2002). La relación entre la fracción recuperada y la real se expresa en términos de porcentaje de recuperación.

El estudio de la *recuperación* se lleva a cabo a tres niveles de concentración: 0,5; 5,0 y 100 ng/mL para cada analito, comparando la concentración añadida y la concentración obtenida (4 replicados), tal y como se recoge en la **Tabla 4.42**.

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

Los valores obtenidos son adecuados porque oscilan entre 85,9% y 104,5%, que son resultados correspondientes al escitalopram (100 ng/mL) y a la mirtazapina (0,5 ng/mL), respectivamente. En consecuencia, se puede concluir que todas las recuperaciones se encuentran próximas al 100%, que sería el valor deseado.

Tabla 4.42: Recuperaciones (%) para tres niveles de concentración (n=4)

Compuesto	Concentración (ng·mL ⁻¹)	Valor medio (ng·mL ⁻¹)	SD	CV (%)	Recuperación
Escitalopram	0,5	0,51	7,7	7,5	103,0
	5	4,8	5,8	5,9	96,7
	100	85,9	10,2	11,8	85,9
Fluvoxamina	0,5	0,49	1,3	1,4	99,0
	5	4,5	12,8	14,1	90,3
	100	100,9	13,7	13,5	100,9
Fluoxetina	0,5	0,45	6,6	7,2	91,0
	5	4,9	10,8	10,7	99,3
	100	99,4	4,8	4,8	99,4
Sertralina	0,5	0,43	7,1	8,1	87,0
	5	4,8	7,7	7,9	96,5
	100	99,9	4,7	4,7	99,9
Venlafaxina	0,5	0,47	4,3	4,6	93,6
	5	4,8	4,7	5,0	93,8
	100	95,3	1,8	1,9	97,7
Mirtazapina	0,5	0,52	7,5	7,2	104,5
	5	4,95	14	14	99,0
	100	100	4,9	4,9	100,0

4.5.3. Referencias

Amundsen I, Øiestad ÅML, Ekeberg D, Kristoffersen L. *Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 927: 112-123 (2013).

Ansermot J, Brawand-Amey M, Eap CB. *Simultaneous quantification of selective serotonin reuptake inhibitors and metabolites in human plasma by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. J Chromatogr B, 885-886: 117-130 (2012).

Asgharinezhad AA, Karami S, Ebrahimzadeh H, Shekari N, Jalilian N. *Polypyrrole/magnetic nanoparticles composite as an efficient sorbent*

for dispersive micro-solid-phase extraction of antidepressant drugs from biological fluids. Int J Pharmaceutics, 494: 102-112 (2015).

Bahrami G, Mohammadi B, Farshchi A, Ghiasi G. *Quantitative analysis of sertraline in human serum by LC with fluorescence detection after pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofuran.* Chromatographia, 70: 323-327 (2009).

Castaign N, Titier K, Receveur-Daurel M, Le-Déodic M, Le-bars D, Moore N, Molimard M. *Quantification of eight new antidepressants and five of their active metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Anal Toxicol, 31: 334-341 (2007).

Chen X, Zheng S, Le J, Qian Z, Zhang R, Hong Z, Chai Y. *Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry.* J Pharm Biomed Anal, 142: 19-27 (2017).

Choong E, Rudaz S, Kottelat A, Haldemann S, Guilleme D. *Quantification of 4 antidepressants and a metabolite by LC-MS for therapeutic drug monitoring.* J Chromatogr B, 879: 1554-1550 (2011).

De Castro A, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. *LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices.* J Pharm Biomed Anal, 48: 183-193 (2008).

De Souza ID, Domingues DS, Queiroz MEC. *Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Talanta, 140: 166-175 (2015).

Dutta L, Ahmad SI, Mukherjee SK, Mishra S, Khuroo A, Monif T. *Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous stereoselective determination of venlafaxine and its major metabolite, O-desmethylvenlafaxine, in human plasma.* Biomed Chromatogr, 27: 622-635 (2013).

Esrafil A, Yamini Y, Shariati S. *Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for*

extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. Anal Chim Acta, 604: 127-133 (2007).

Fan YC, Hu ZL, Chen ML, Tu CS, Zhu Y. *Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples.* Chin Chem Lett, 19: 985-987 (2009).

Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation* (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

Frahnert C, Rao ML, Grasmäder K. *Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring.* J Chromatogr B, 794: 35-47 (2003).

Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A. *Three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tricyclic antidepressant drugs: Comparison with conventional three-phase hollow fiber microextraction.* J Chromatogr A, 1222: 5-12 (2012).

Gonzalves Silva BJ, Lanzas FM, Costa Queiroz ME. *In tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma,* J Chromatogr B, 862: 181-188 (2008).

Govantes C, Oca L, Ayuso L. *Fármacos antidepresivos y antimaníacos* in Velázquez BL (ed) *Farmacología básica y clínica*. 18ª ed. Medical Americana. Madrid (2009).

Greiner C, Hiemke C, Bader W, Haen E. *Determination of citalopram and escitalopram together with their active main metabolites desmethyl (es-) citalopram in human serum by column-switching high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric detection.* J Chromatogr B, 848: 391-394 (2007).

Hamed R, Hadjmohammadi MR. *Optimization of alcohol-assisted dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design for the rapid determination of fluoxetine in biological samples.* J Sep Sci, 39: 4784-4793 (2016).

Harvey D. *Química Analítica Moderna*. Edit Mc Graw Hill, Madrid, 2002. Pág 43-46.

He L, Feng F, Wu J. *Determination of sertraline in human plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry and method validation*. J Chromatogr Sci, 43 (10): 532-535 (2005).

International Conference on Harmonization (2005). *Validation of analytical procedures: Methodology ICH Q2 B*. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

Juan H, Zhiling Z, Huande L. *Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI)*. J Chromatogr B, 820: 33-39 (2005).

Kirchherr H, Kühn-Velten VN. *Quantitative determination of forty eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach*. J Chromatogr B, 843: 100-113 (2006).

Kobilinsky A. “*Les plans factoriels*” en Droesbeke JJ, Fine J, Saporta G. “*Plans d’expériences. Applications à l’entreprise*”. Ed Technip. Paris 1997.

Labat L, Deveaux M, Dallet P, Dubost JP. *Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar eletrokinetic capillary chromatography*. J Chromatogr B, 773: 17-23 (2002).

Lacassie E, Gaulier JM, Marquet P, Rabatel JF, Lachâtre G. *Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum, using high-performance liquid chromatography and gas chromatography*. J Chromatogr B, 742: 229-238 (2000).

Lemos Pinto MA, de Souza ID, Costa Queiroz ME. *Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 139: 116-124 (2017).

Leong M, Huang S. *Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection*. J Chromatogr A, 1211: 8-12 (2008).

Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical experimental design*. Ed Marcel Dekker. New York. 1999.

Li KM, Thompson MR, McGregor IS. *Rapid quantitation of fluoxetine and norfluoxetine in serum by micro-disc solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection*. J Chromatogr B, 804: 319-326 (2004).

Lili L, Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Zhang G. *Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 1217: 2365-2370 (2010).

Lin E-P, Chiu T-C, Hsieh M-M, *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with acetonitrile stacking through capillary electrophoresis for the determination of three selective serotonin reuptake inhibitor drugs in body fluids*. J Sep Sci, 39: 4841-4850 (2016).

Llerena A, Dorado P, Berecz R, González A, Norberto MJ, De la Rubia A, Cáceres M. *Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients*. J Chromatogr B, 783: 25-31 (2003).

Malfará WR, Bertucci C, Costa Queiroz ME, Dreossi Carvalho SA, Pires Bianchi ML, Cesarino EJ, Crippa JA, Costa Queiroz RH. *Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants*. J Pharm Biomed Anal, 44: 955-962 (2007).

Mashayekhi A, Abroomand P, Saber-Tehrani M, Husain SW. *Rapid determination of carbamazepine in human urine, plasma samples and water using DLLME followed by RP-LC*. Chromatographia, 71: 517-521 (2010).

Mathieu D, Nony J, Phan-Tan-Luu R. (2000) NemrodW®, versión 2000. LPRAI, Marseille.

Melwanki MB, Fuh M. *Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction and approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples*. J Chromatogr A, 1207: 24-28 (2008).

Miller JM, Miller JC. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª Edic, Edit Prentice Hall, Madrid, 2002. Pág 125.

Miranda LFC, Domingues DS, Queiroz MEC. *Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for analysis of venlafaxine, O-desmethylvenlafaxine, and N-desmethylvenlafaxine in plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1458: 46-53 (2016).

Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (eds). *Clarke's analysis of drugs and poisons* Vol 2. 3ªEd. Pharmaceutical Press. London. 2004.

Montenarh D, Wernet MP, Hopf M, Maurer HH, Schmidt PH, Ewald AH. *Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS-comparative validation in whole blood, plasma and serum*. Anal Bioanal Chem 406: 5939–5953 (2014).

Nagaraju D, Huand D. *Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography- ion trap mass spectrometry*. J Chromatogr A, 1161: 89-97 (2007).

Phan Tan Luu R. *Metodología estadística en investigación medioambiental*. Instituto Vasco de Estadística. Victoria. 1993.

Pouliopoulos A, Tsakelidou E, Krokos A, Gika HG, Theodoridis G, Raikos N. *Quantification of 15 psychotropic drugs in serum and postmortem blood samples after a modified mini-QuEChERS by UHPLC–MS-MS*. J Anal Toxicol 42: 337–345 (2018).

Psillakis K, Kalogerakis N. *Developments in liquid-phase microextraction*. Trends Anal Chem, 22: 565-574 (2003)

Qin XY, Meng J, Li XY, Zhou J, Sun XL, Wen AD. *Determination of venlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography using cloud-point extraction and spectrofluorimetric detection*. J Chromatogr B, 872: 38-42 (2008).

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacología*. 6ª ed. Elsevier. Madrid. 2008.

Rani S, Kumar A, Malik AK, Singh B. *Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS*. Chromatographia, 74: 235-242 (2011).

Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. *Full validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric procedure for target screening and quantification*

of 34 antidepressants in human blood plasma as part of a comprehensive multi-analyte approach. Anal Bioanal Chem, 400: 2093-2107 (2011).

Rezaee M, Assadi Y, Milani M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.* J Chromatogr A, 1116: 1-9 (2006).

Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. *Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. Review.* J Chromatogr A, 1217: 2342-2357 (2010).

Rodrigues Chaves A, Chiericato JG, Costa Queiroz ME. *Solid-phase microextraction using poly(pirrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples.* J Chromatogr B, 877: 587-593 (2009).

Rodrigues Chaves A, Leandro FZ, Carris JA, Queiroz MEC. *Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection.* J Chromatogr B, 878: 2123-2129 (2010).

Rodrigues Chaves A, Silva SM, Costa Queiroz RH, Lanças FM, Costa Queiroz ME. *Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples.* J Chromatogr B, 850: 295-302 (2007).

Rosado T, Gonçalves A, Martinho A, Alves G, Duarte AP, Domingues F, Silvestre S, Granadeiro LB, Oliveira V, Leitão C, Gallardo E. *Simultaneous quantification of antidepressants and metabolites in urine and plasma samples by GC-MS for therapeutic drug monitoring.* Chromatographia, 80: 301-328 (2017).

Ryan TP. *Modern Experimental Design.* Edit. Wiley. New Jersey. 2007.

Sabbioni C, Bugamelli F, Varani G, Mercolini L, Musenga A, Saracino MA, Fanali S, Raggi MA. *A rapid HPLC-DAD method of analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients.* J Pharm Biomed Anal, 36: 351-356 (2004).

Saber AL. *On-line phase extraction coupled to capillary LC-ESI-MS for determination of fluoxetine in human blood plasma.* Talanta, 78: 295-299 (2009).

Saracino MA, Mercolini L, Flotta G, Albers LJ, Merli R, Raggi MA. *Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high- performance liquid chromatography*. J Chromatogr B, 843: 227-233 (2006).

Saraji M, Boroujeni MK, Hajialiakbari AA. *Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography*. Anal Bioanal Chem, 400: 2149-2158 (2011).

Sempio C, Morini L, Vignali C, Groppi A. *Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples*. J Chromatogr B, 970: 1-7 (2014).

Soares Domingues D, Lemos Pinto MA, De Souza ID, Hallak JEC, De Souza Crippa JA, Costa Queiroz ME. *Determination of drugs in plasma samples by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for therapeutic drug monitoring of schizophrenic patients*. J Anal Toxicol, 40: 22-36 (2016).

Steuer AE, Poetzsch M, Koenig M, Tingelhoff E, Staeheli SN, Roemmelt AT, Kraemer T. *Comparison of conventional liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics in whole blood*. J Chromatogr A, 1381: 87-100 (2015).

Tournel G, Houdret N, Hédouin V, Deveaux M, Gosset D, Lhermitte M. *High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum*. J Chromatogr B, 761: 147-158 (2001).

Unceta N, Gómez-Caballero A, Sánchez A, Millán S, Sampedro MC, Goicolea MA, Sallés J, Barrio RJ. *Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography*. J Pharm Biomed Anal, 46: 763-770 (2008).

Unceta N, Ugarte A, Sánchez A, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. *Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD*

method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples. J Pharm Biomed Anal, 51: 178-185 (2010).

Vlase L, Imre S, Leucuta S. *Determination of fluoxetine and its N-desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography.* Talanta, 66: 659-663 (2005).

Weisskopf E, Panchaud A, Nguyen KA, Grosjean D, Hascoët JM, Csajk C. *Stereo selective determination of citalopram and desmethylocitalopram in human plasma and breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry* J Pharm Biomed Anal, 131: 233–245 (2016).

Wózniakiewicz M, Wietcecha-Posluszny R, Garbacik A, Koscielniak P. *Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination.* J Chromatogr A, 1190: 52-56 (2008).

Xiong C, Ruan J, Cai Y, Tang Y. *Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography.* J Pharm Biomed Anal, 49: 572-578 (2009).

Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Yu Q, Feng Y. *Analysis of hexanal and heptanal in human blood by simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction then LC-APCI-MS-MS.* Chromatographia, 70: 775-781 (2009).

Zgota-Grzeskowiak A. *Application of DLLME to isolation and concentration of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples.* Chromatographia, 72: 671-678 (2010).

Zheng MM, Wang ST, Hu WK, Feng YQ. *In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma.* J Chromatogr A, 1217: 7493-7501 (2010).

5. CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado en esta memoria ha supuesto una contribución al análisis de compuestos bioactivos de interés toxicológico en matrices biológicas como plasma y fluido oral.

Las principales ventajas de las metodologías propuestas son la simplicidad, la rapidez y la reducción del consumo de reactivos, así como la selectividad y el menor coste del análisis por cromatografía con detector de red de diodos.

La validación de los métodos analíticos desarrollados en términos de linealidad, precisión y exactitud ha proporcionado resultados satisfactorios. Este aspecto es muy valioso en la investigación bioanalítica forense de calidad y en el análisis de rutina, ya que finalmente se elabora un informe con los datos analíticos obtenidos, que deben ser de confianza.

En resumen, la investigación llevada a cabo para esta tesis doctoral ha contribuido ampliamente al desarrollo de metodologías analíticas para el control sostenible, en un entorno forense o clínico, de drogas de abuso y antidepresivos en una matriz de uso habitual (plasma) y otra matriz poco invasiva (fluido oral).

Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en esta Tesis se resumen a continuación:

1.- Determinación de drogas de abuso en plasma

- Se ha desarrollado un método de HPLC-PDA para la separación y cuantificación de 8 drogas de abuso (morfina, 6-acetilmorfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) en plasma.
- Se ha propuesto un método de preparación de muestra basado en SPE con cartuchos de extracción Bond Elut Certify que permitió obtener extractos más limpios, y por consiguiente

mejores resultados de precisión y exactitud. La principal ventaja de SPE es que con un colector de vacío se puede utilizar para la extracción y concentración simultáneas de varias muestras.

- Los resultados de validación del método fueron aceptables según criterios establecidos por la FDA, y similares o mejores que los publicados por otros autores.
- El método analítico ha demostrado su efectividad en el análisis de rutina de un laboratorio de toxicología, al ser aplicado a 21 muestras de plasma procedentes de casos de sobredosis. Los datos obtenidos han permitido elaborar un estudio estadístico de la presencia de drogas.

2.- Determinación de drogas de abuso en fluido oral

- Se ha desarrollado un método de HPLC-PDA para la separación y cuantificación de 7 drogas de abuso (morfina, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP) en fluido oral.
- Se ha propuesto un método de preparación de muestra basado en LLE utilizando los dispositivos comerciales Toxítubos A. Sus principales ventajas son la simplicidad de la técnica y el bajo consumo de muestra, reactivos y disolventes, lo que facilita el trabajo de preparación de muestra en los laboratorios de toxicología.
- Se han obtenido resultados de linealidad, precisión y exactitud (% error relativo) similares a los publicados por otros autores, que usaron SPE o LLE convencional, y otros detectores cromatográficos (UV, MS, MS-MS).
- El método analítico ha demostrado su efectividad en el análisis de rutina de un laboratorio de toxicología, al ser aplicado a 29 muestras de fluido oral procedentes de consumidores de opiáceos y/o cocaína que estaban bajo un programa de desintoxicación. Los datos obtenidos han permitido elaborar un estudio estadístico de la presencia de drogas.

3.- Determinación de antidepresivos en plasma

- Se ha desarrollado un método de UPLC-PDA para la separación y cuantificación de 6 antidepresivos (escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, mirtazapina, sertralina y venlafaxina) en plasma. El análisis mediante UPLC añade la rapidez a las ventajas de sencillez y bajo coste del análisis con HPLC convencional.
- Se ha propuesto un método de preparación de muestra basado en DLLME asistida por US, que ofrece las ventajas de la miniaturización y el coste reducido de los dispositivos utilizados. Es una técnica rápida y requiere el consumo de microlitros de muestra y disolventes, que conducen a extracciones más ecológicas y eficientes.
- Se ha empleado una herramienta quimiométrica para la optimización del procedimiento de extracción de muestras, basada en el uso de diseños experimentales, que implica un número reducido de experimentos. En primer lugar, se aplicó un diseño experimental de screening o cribado para evaluar simultáneamente el efecto de cuatro factores que influyen en la DLLME, así como las principales interacciones entre ellos. A continuación, se utilizó un diseño pentagonal de superficie de respuesta y funciones de deseabilidad para encontrar las condiciones óptimas de compromiso para el volumen de disolvente extractante y el pH.
- Los resultados obtenidos con la validación del método completo mostraron buena linealidad, precisión y exactitud en términos de porcentaje de recuperación.
- El método analítico ha demostrado su fiabilidad en el análisis de rutina de un laboratorio de toxicología, al ser aplicado a 29 muestras de plasma procedentes de individuos vivos y muestras postmortem.
- Además, se obtuvieron resultados comparables para 19 casos analizados mediante US-DLLME-UPLC-PDA y LLE-GC-MS. La utilización de la primera técnica presenta las ventajas de la simplicidad, la rapidez de la extracción y del análisis

cromatográfico (menos de 3 minutos), y no requiere una etapa de derivatización de los analitos, necesaria para su análisis mediante GC-MS.

- Se ha desarrollado un método de UPLC-MS/MS para la determinación de esta familia de compuestos. El uso de esta técnica que emplea el modo MRM permitió una determinación rápida, selectiva y sensible de los analitos de interés en los extractos obtenidos por US-DLLME.
- Se optimizaron los parámetros operacionales para la detección por espectrometría de masas en modo ESI+, incluido el voltaje capilar, la temperatura de secado o desolvatación, el flujo (N_2) de secado o desolvatación, el gas de flujo de nebulización (N_2) y la fuente de ionización de temperatura.
- Se ha evaluado el efecto matriz mediante una calibración en matriz, tipo matrix-matched, y posteriormente se validó el método analítico.
- Comparativamente, el método de UPLC-PDA exhibió ventajas tales como buena resolución, alta sensibilidad, corto tiempo de análisis y bajo consumo de disolventes, y por lo tanto reducido coste de análisis. El método de UPLC-MS/MS permitió además la determinación inequívoca de todos los compuestos de interés.

6. ANEXOS







DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/10/2015 el estudio:

Título: Técnicas de microextracción aplicadas al control de drogas emergentes en seguridad vial

Promotor: Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

Tipo de estudio: Outros

Código de Registro: 2015/488

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por la investigadora del centro:

Centros	Investigadores Principales
Universidad de Santiago de Compostela	Rosa Antonia Lorenzo Ferreira

En Santiago de Compostela, a 21 de octubre de 2015
El secretario

NOMBRE
VAZQUEZ LAGO
JUAN MANUEL
NIF 44829259M

Firmado digitalmente por NOMBRE
VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL - NIF
44829259M
Nombre de reconocimiento (DN): cn=ES,
ou=PMIT, ou=PMIT Clase 2 CA,
o=501090161, cn=NOMBRE VAZQUEZ
LAGO JUAN MANUEL - NIF 44829259M
Fecha: 2015.10.27 09:54:07 +01'00'

Juan M. Vázquez Lago



HPLC–DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma

P. Fernandez, L. Morales, C. Vázquez, A.M. Bermejo,
M.J. Tabernero

[HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their
metabolites in plasma. - PubMed - NCBI](#)





**Comparison of two extraction procedures for
determination of drugs of abuse in human saliva
by high-performance liquid chromatography**

P. Fernández, L. Morales, C. Vázquez, M. Lago
and A. M. Bermejo

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615842>





Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design

P. Fernández, V. Taboada, M. Regenjo, L. Morales, I. Alvarez,
A.M. Carro, R.A. Lorenzo

[Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. - PubMed - NCBI](#)







La preparación de la muestra es un paso esencial para los análisis toxicológicos forenses, relacionados con matrices biológicas complejas y bajas concentraciones de analito. Por ello, el objetivo principal es el desarrollo de metodologías analíticas simples, económicas y eficientes que conlleven el empleo de diferentes técnicas de extracción, como la extracción en fase sólida (SPE), la extracción líquido-líquido (LLE) con toxitubos y la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida con ultrasonidos (US-DLLME). La identificación y cuantificación de los analitos se realiza mediante cromatografía líquida de alta y/o ultra resolución (HPLC y/o UPLC) con detección de red de diodos y espectrometría de masas en tandem (MS/MS). Se describen diferentes aplicaciones en el ámbito de la toxicología forense, centradas en: (i) muestras de plasma y saliva para la determinación de drogas de abuso y (ii) muestras de plasma para el control clínico y toxicológico de antidepresivos.